

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

**Umělá reprodukce kapra s využitím
alternativních způsobů odlepkování jiker**

Autoři

V. Kašpar, M. Hubálek, R. Franěk, V. Novotný, D. Gela

č. 201

Vodňany

ISBN 978-80-7514-194-1

Obsahová část, vydání a tisk metodiky jsou výsledkem řešení výzkumného projektu:

QK1910428 Uchování genetických zdrojů kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk (2019–2023, odpovědný řešitel: Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.)

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
2.1 ÚVOD	4
2.2 Generační ryby a jejich příprava k umělé reprodukci.....	7
2.3 Anestezie	9
2.4 Indukce reprodukce.....	10
2.5 Odběr pohlavních produktů	12
2.6 Osemenění a oplození	13
2.7 Odlepkování jiker.....	15
2.8 Tanin a použití taninu pro odlepkování jiker kapra obecného.....	16
2.9 Acetylcystein a použití.....	25
2.10 Inkubace jiker	27
2.11 Období endogenní výživy	31
2.12 Počítání váčkového plůdku, expedice, transport a nasazení	32
2.13 Závěr	33
3. Srovnání novosti postupů.....	34
4. Popis uplatnění certifikované metodiky.....	34
5. Ekonomické aspekty	35
6. Seznam použité literatury	35
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	36

1. CÍL METODIKY

Metodika popisuje základní postup reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio*) s využitím alternativních postupů odlepkování jiker pro inkubaci v podmínkách průtočných nebo recirkulačních líhní. Tyto nové postupy odlepkování se významně liší od metod běžně používaných pro tento účel, kdy je lepivý obal jiker obalován nejčastěji mléčným tukem z emulze čerstvého nebo suspenze sušeného mléka, aby došlo k umožnění inkubace v systému rybí líhně. Při aplikaci postupů popsanych v této metodice naopak dochází k odstranění lepivého obalu jikry a do oplozených a inkubovaných jiker není vnášen cizorodý materiál, který by mohl negativně ovlivňovat efektivitu inkubace. Toho je docíleno za použití taninu (kyselina taninová, kyselina tříslová) nebo acetylcysteinu. Odlepkování kapřích jiker pomocí těchto látek bylo optimalizováno a jeho účinnost opakovaně provozně ověřena v podmínkách rybí líhně Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod. V předkládané metodice jsou podrobně popsány všechny dílčí kroky tak, aby bylo možné námi optimalizovaný postup efektivně aplikovat a zároveň jsou popsány dosavadní zkušenosti a dosahované výsledky při aplikaci popisovaných postupů.

Metodu je možné aplikovat při umělé reprodukci kapra v rybích líhních bez rozdílu velikosti, zejména z důvodu jednoduchosti a časové nenáročnosti postupu, stejně tak minimálních nároků na technické vybavení líhně.

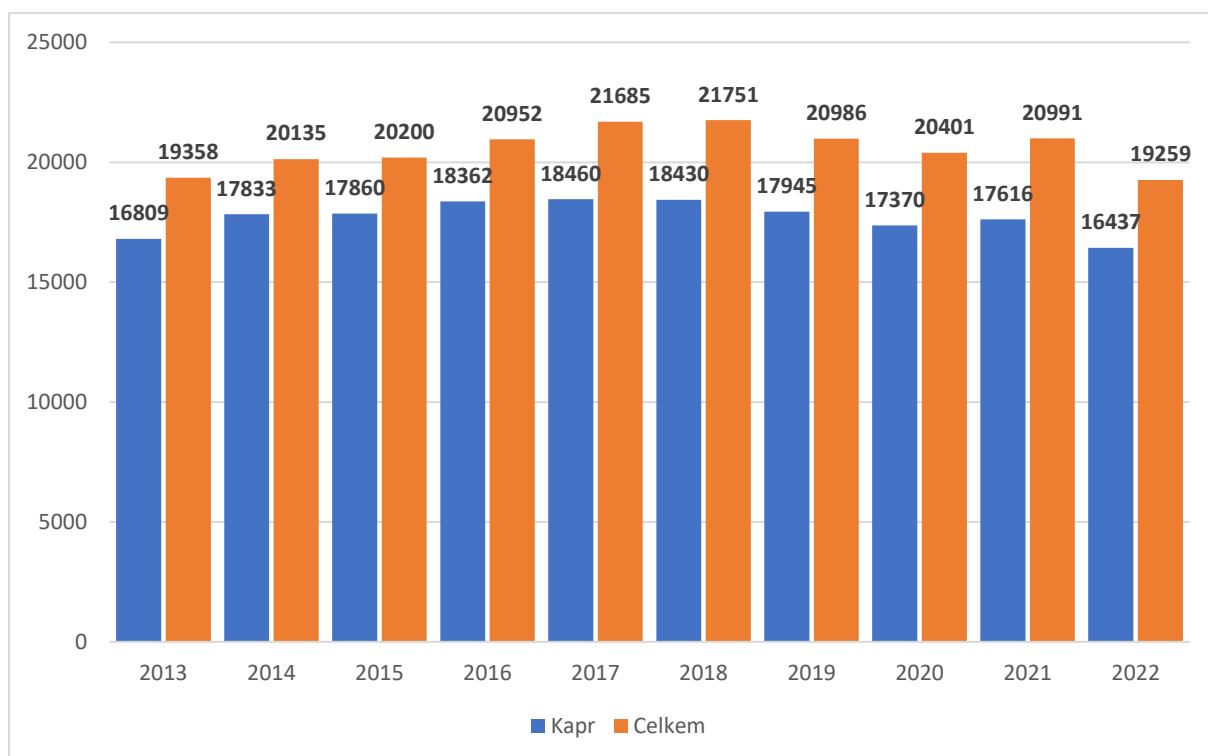
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Generační ryby kapra obecného jsou připraveny k umělé reprodukci pomocí hormonální stimulace – intramuskulární injekcí kapří hypofýzy nebo syntetických analogů. Pohlavní produkty jsou získávány jemným tlakem na břišní dutinu. Po řízeném osemenění je provedena aktivace gamet přidáním vody ze systému rybí líhně v množství přibližně poloviny objemu oplozovaných jiker. Na rozdíl od běžného postupu nejsou po oplození jikry promývány vodou z líhně, ale po dalších 10-12 min jsou ručně nebo pomocí laboratorní třepačky míchány a voda je dolévána postupně po malém množství tak, aby jikry mohly bobtnat. Po této době jsou jikry doplněny roztokem taninu (2 g.l^{-1}) nebo acetylcysteinu ($0,4 \text{ g.l}^{-1}$) o objemu odpovídajícím objemu jiker. Po přibližně 30 sekundách promývání je odstraněn supernatant a jikry jsou znovu doplněny roztokem taninu nebo acetylcysteinu a to je opakováno celkem 4x, aby celková doba působení odlepkovacího roztoku byla minimálně 2-2,5 min. Poté jsou jikry promyty a nasazeny k inkubaci např. do Zugských lahví.

2.1 ÚVOD

Kapr obecný patří mezi nejstarší domestikované druhy ryb na světě (Balon, 1995) a současná celosvětová roční produkce tohoto druhu v akvakultuře dosahuje úrovně více než 4 miliony tun (FAO, 2022). Tato skutečnost řadí kapra mezi nejvýznamnější akvakulturně produkované druhy ryb, v roce 2022 zaujímal tento druh čtvrtou pozici ve výčtu druhů s nejvyšší celosvětovou produkcí ze sladkovodních akvakultur.

Podle statistických údajů Rybářského sdružení ČR produkce kapra v České republice v posledních deseti letech dosahovala relativně stabilní úrovně v rozmezí 16 809 – 21 751 t (Obrázek 1). Kapr obecný představuje přibližně 85 % akvakulturní produkce České republiky.

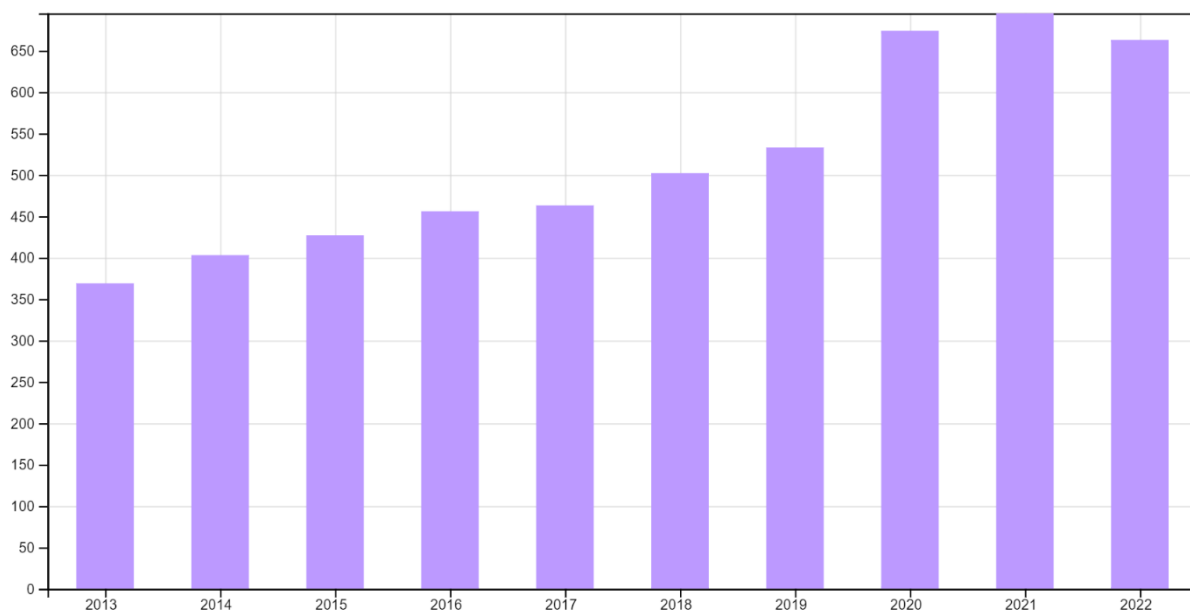


Obrázek 1: Graf - produkce kapra obecného v České republice a porovnání s celkovou produkcí ryb v období 2013 – 2022 (roční produkce v t, data Rybářského sdružení ČR).

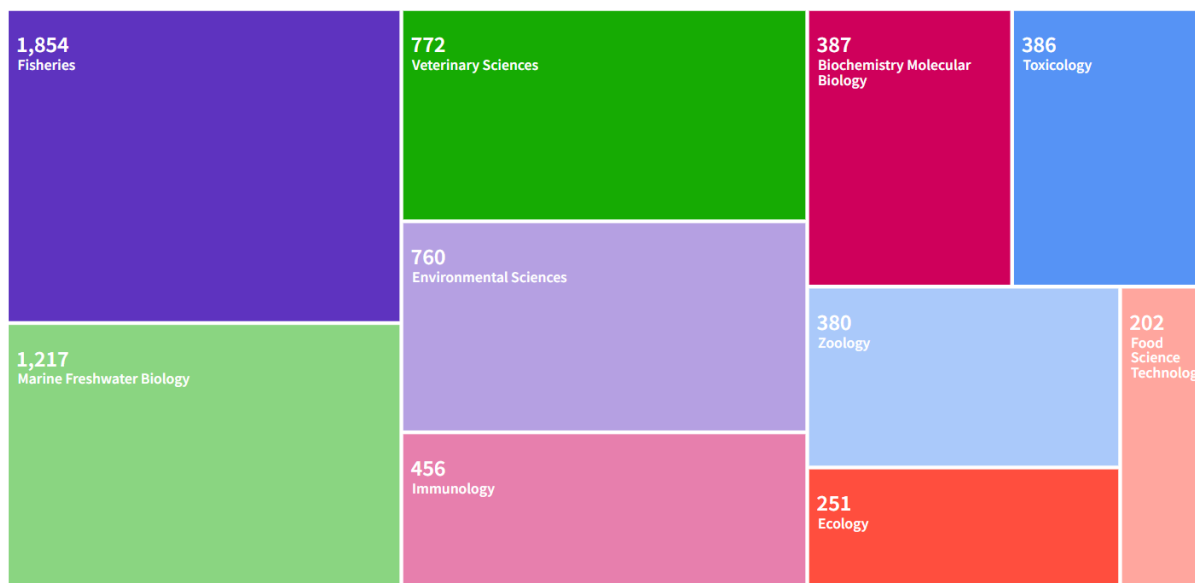
Domestikací proces u kapra probíhal paralelně v Evropě i Asii a následná šlechtitelská práce vyústila v existenci celé řady plemen a linií využívaných v rybníční akvakultuře. Přehled plemen a linií chovaných v ČR uvádí Pokorný a kol. (1996). Kapr je začleněn do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství od samotného počátku tohoto programu v roce 1996. V současné době je do programu začleněno 11 plemen a linií kapra obecného. V rámci Národního programu jsou formou kmenových hejn tato plemena udržována a periodicky obnovována. Obnova kmenových hejn se provádí výhradně umělým výtěrem při specifických technicko-chovatelských opatřeních, např. inkubaci jiker ve fyzicky odděleném systému nebo v jiném období, než jsou inkubovány jikry určené k produkci tržních ryb (Flajšhans a kol., 2009, Kocour a kol., 2012).

Prakticky celá produkce váčkového plůdku kapra pro komerční chovatelská zařízení v ČR pochází z rybích líhní a uměle řízené reprodukce generačních ryb. Profesionální líhně jsou kapacitně schopny v jednom výtěru kapra připravit a na trh dodat jednotky až desítky miliónu kusů rozplavených jedinců kapra. Podpora přirozeného rozmnožování kapra ve výtěrových rybnících s odlovem rozplaveného váčkového plůdku je v ČR marginální, spíše jen pro privátní malochovy. Výjimkou je reprodukce nejhodnotnějších KOI, v takovém případě chovatelé většinou provádí reprodukci bez aplikace hormonální stimulace a ve speciálních nádržích s cílem dosáhnout maximální možné efektivity reprodukce a minimálního poškození generačních KOI. Snahou každého majitele a chovatele takto cenných ryb je omezení jakékoliv manipulace s rybami pouze na nezbytné minimum, proto nepřístupují k řízené reprodukci.

Kapr obecný není pouze druhem významným pro akvakulturu, tento druh našel poměrně rozsáhlé uplatnění i v rámci aktivit základního a aplikovaného výzkumu – viz Obrázek 2 a Obrázek 3. Důvodem jsou některé charakteristické vlastnosti tohoto druhu, například snadná indukce reprodukce, externí oplození, vysoká relativní plodnost, rychlý vývoj gamet, jednoduchá inkubace v laboratorních podmínkách nebo jednoduchý odchov v kontrolovaných podmínkách chovatelských zařízení.



Obrázek 2: Graf – význam kapra obecného v základním i aplikovaném výzkumu za posledních 10 let. Graf znázorňuje narůstající roční počty publikací – klíčové slovo “common carp” v databázi Web of Science mezi léty 2013 a 2022.



Obrázek 3: Graf – kapra obecného v základním i aplikovaném výzkumu za posledních 10 let. Deset vědních oborů s největším počtem publikací s využitím tohoto modelového druhu – kapra obecného.

V současnosti nejvíce používaný způsob eliminace lepivosti jiker pomocí emulze čerstvého nebo suspenze sušeného mléka představuje zanášení cizorodých látek biologické povahy do systému rybí líhně a zejména v recirkulačních líhních pak může způsobovat problémy s bakteriálními a plísňovými infekcemi nebo zbytečně komplikovat čištění a dezinfekci systému mezi jednotlivými výtěry. Zvýšení efektivity umělé reprodukce a výrazné zkrácení procesu odlepkování jiker pro inkubaci v podmínkách

rybí líhně pomocí nové metody má velký potenciál zvýšit efektivitu a zjednodušit doposud používané postupy.

2.2 Generační ryby a jejich příprava k umělé reprodukci

Všechny produkci významné rybí líhně v ČR mají svůj generační materiál založen na dlouholetém vlastním chovu plemenných ryb nebo místních linií kapra obecného, které jsou odděleny od rybích obsádek využívaných pro násadové nebo konzumní účely. V případě zájmu chovatele o získání nových plemen, příp. linií pro obnovu genové banky *in situ*, si zájemce může prostřednictvím Rybářského sdružení České republiky vyžádat nebo přes členskou část jejich webového rozhraní stáhnout informace o užitkovosti jednotlivých plemen nebo kříženců kapra obecného, stejně jako kontaktní informace o aktuálních držitelích čistokrevných plemen nebo linií k produkci kříženců (Gela a kol., 2009). Dlouhodobě nejžádanějšími meziplemennými kříženci s výbornými užitkovými vlastnostmi (přírůstek tělesné hmotnosti, % přežití od nasazení váčkového plůdku, výtěžnost opracovaného trupu ryb v tržní hmotnosti) mezi lysými hybridy jsou Maďarský lysec M2 na pozici mateřské a na pozici otcovské Amurský lysec (AL) nebo Severský lysec (M72) pro všechny klimatické podmínky v rámci ČR nebo Pohořelický lysec (PoL), který by měl být preferován spíše pro teplotně příznivější klima. U šupinatých meziplemenných kříženců má mezi praktiky nejlepší ohlas kombinace Ropšínský kapr (ROP) na pozici mateřské a maďarský Tatajský kapr šupinatý (TAT), případně Třeboňský kapr šupinatý (TŠ) nebo Mariánskolázeňský kapr šupinatý (ML) v otcovské pozici křížení. Lokální rybí líhně pro produkci váčkového plůdku kapra využívají plemena Telčského lysce (Te), Žďárského kapra šupinatého (Žd-Š) a lysesého (Žd-L).

Pro výtěr kapra jsou vybírány ryby po dosažení optimální pohlavní zralosti, což je v podmínkách České republiky v případě samců věk $K_{3+} - K_4$ a v případě samic $K_4 - K_5$. Nejlepších reprodukčních ukazatelů dosahují ryby mezi šesti až deseti lety při individuální hmotnosti do 12 kg (Gela a kol., 2009). Poté je vhodnější přistupovat k pravidelné obměně generačního hejna a doplnění generačního hejna mladšími rybami příslušných linií a plemen reprodukovány podle odpovídající metodiky (Flajšhans a kol., 2009). Pro individuální značení remontních ryb nebo ryb generačního hejna se nejlépe osvědčila kombinace mikročipových značek – P.I.T., případně kombinace takového značení s kryogenní metodou pomocí tekutého dusíku u lysých plemen a populací u kapra obecného (Rodina a Flajšhans, 2008). Mikročipové značky se nejčastěji implantují intramuskulárně pomocí sterilního jednorázového nebo desinfikovaného opakovaně využitelného implantátoru. Aplikace se provádí do hřbetní svaloviny na levém boku ryby zhruba na úrovni prvního tvrdého paprsku hřbetní ploutve nebo za hlavou, kraniálním směrem pod úhlem asi 30° do hloubky 1 až 1,5 cm (Rodina a Flajšhans, 2008). Takovým značením generačních ryb je zabezpečena důsledná evidence generačních ryb v chovu i v průběhu samotné umělé reprodukce.

Příprava ryb před výtěrem začíná v jarním období výlovem komorového rybníka (rybníků) a převezením celé obsádky generačních ryb do vhodných manipulačních rybníků nebo sádek, kde je možnost postupného odlovování a provedení individuálního výběru požadovaných skupin a počtů pro zajištění výtěrové sezóny. Je vhodné do manipulačních nádrží nasadit ryby v mírném nadbytku tak, aby byla zabezpečena produkce odpovídajících plemen a linií a finální výběr ryb bylo možné realizovat podle aktuální kondice ryb až při nasazení ryb do systému rybí líhně pro hormonální stimulaci. Ryby, které nebyly vybrány pro reprodukci v daném roce a nebyly vyřazeny z chovu, se vrací zpět do chovného rybníka.

Při posuzování ryb se zpravidla hodnotí následující faktory (řazeno podle priority):

- a) Zdravotní stav. Pouze ryby v kondici, bez výrazného mechanického poškození kůže, šupin a žaber a bez příznaků nemocí jsou vybírány k případné reprodukci. Ryby vážně nemocné či silně poraněné

se doporučuje z generačního hejna vyřadit. Ostatní ryby se vrátí do matečného rybníka k rekonvalescenci.

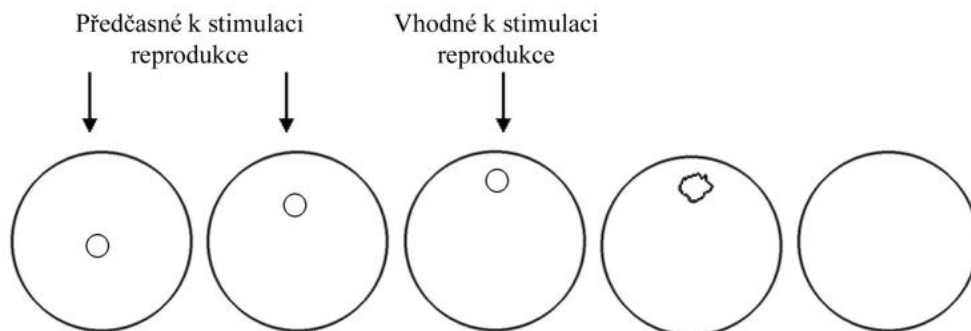
- b) Pohlaví ryb a založení pohlavních produktů. Pohlaví ryb se určuje a eviduje před zařazením ryb do generačního hejna, v dalším období se pouze provádí kontrola u ryb, kde nemá chovatel 100% jistotu nebo hodnotí založení pohlavních produktů. Pohlaví se určuje dle tvaru břišní dutiny a močopohlavní papily. Břišní dutina samic je v jarním období již zaplněna oocyty, je zpravidla výrazně zvětšená, zaoblená a většinou již měkká. Močopohlavní papila je zpravidla oválná. U samců je břišní dutina užší a močopohlavní papila šterbinovitá. Tyto znaky však nemusí být zcela spolehlivé a jsou závislé i na plemeni či linii, která je posuzována. Proto je vždy vhodnější se přesvědčit, zda hodnocený jedinec neuvolňuje sperma při jemné masáži břišní části těla. Ryby, u kterých nebylo po několik let možno spolehlivě určit pohlaví nebo vykazovaly v předchozích letech nízké reprodukční ukazatele či opakovanou nepřipravenost k reprodukci, chovatel z generačního hejna vyřadí.
- c) Optimální hmotnost zjištěná při individuálním vážení a minimálně jednou za období života ryby v generačním hejnu i ostatní délkové ukazatele (viz Flajšhans a kol., 2009).
- d) Jednoznačná identifikace dle individuálního (P.I.T.) či skupinového značení v případě používání kryogenní metody. Neidentifikované ryby je nutno vyřadit, aby nedošlo k záměně s jedincem jiného plemene či s jiným jedincem. U ryb se zhoršenou čitelností značky se provede přeznačení (Gela a kol., 2009).

Ryby dále připravované pro reprodukci se vysadí do menších rybníčků přírodního charakteru tak, aby byly rozděleny dle pohlaví a plánovaného termínu výtěru. V manipulačních nádržích se rybám zajistí dostatečné množství kvalitní, nejlépe přirozené potravy. V případě potřeby se přikrmuje obilovinami nebo krmnými směsmi průměrně dvakrát až třikrát týdně, přičemž denní dávka činí až 5 % celkové hmotnosti nasazených ryb v rybníce. Pověřená obsluha pravidelně kontroluje a zabezpečuje optimální podmínky prostředí (hodnoty O₂, teplota vody, dostatečná krmná dávka).

Před umělou reprodukcí je také možné ověřit připravenost generačních ryb samičího pohlaví odběrem malého množství oocytů. U části generačních ryb je po anestezii (viz kapitola 2.3) v období před samotnou výtěrovou sezonou skrze pohlavní papilu odebírán speciálním katetrem s tuhou skleněnou nebo plastovou pipetou o vnitřním průměru 3mm vzorek jiker, který slouží k určení polohy jádra. Pipeta nebo kapilára k odběru vzorku jiker spojená tenkou hadičkou s běžnou injekční stříkačkou slouží k odsátí vzorku jiker do fyziologického roztoku (Obrázek 4 a Obrázek 5) a tyto jikry jsou následně doplněny přibližně pětinasobkem prosvětlovacího roztoku (95 ml fyziologického roztoku + 5 ml koncentrované kyseliny octové). Po prosvětlení inkubací v tomto roztoku jikernačky optimálně připravené k indukci umělé reprodukce vykazují jádra jiker výrazně mimo střed samotných jiker, jasně patrná a ohraničená (Obrázek 6).



Obrázek 4 a Obrázek 5: Odběr oocytů pomocí soupravy (foto V. Kašpar)



Obrázek 6: Určování optimální zralosti jikernaček podle migrace jádra oocytu (podle Gela a kol, 2009 a Linhart a kol., 2004).

2.3 Anestezie

Pro manipulaci s generačními rybami je v průběhu přípravy umělé reprodukce využívána anestezie, nejčastěji využívanými anestetiky jsou v současné době 2-phenoxyethanol (ethylen glycol monophenyl ether, např. Merck), hřebíčkový olej (eugenol, např. Dr. Kulich Pharma) nebo MS222 (např. Sigma-Aldrich). Anestezie zmírňuje stres ryb v průběhu manipulace a minimalizuje pravděpodobnost zranění ryb a případných ztrát. Ryby jsou po odchytu z manipulačních nádrží vloženy do běžných rybářských kádí s výškou vodního sloupce cca 50 cm s anestetikem, v případě 2-phenoxyethanolu se používá koncentrace $0,3-0,4 \text{ ml.l}^{-1}$ (Kolářová a kol., 2007) a v případě hřebíčkového oleje pak dávka $0,07 \text{ ml.l}^{-1}$ a v případě MS222 dávka $25-100 \text{ mg.l}^{-1}$ (Topic Popovic a kol., 2012). Ryby je vhodné uvést do fáze anestezie označované jako 3a-3b (Kolářová a kol., 2007), kdy ryby po uvedení do polohy na boku v této poloze setrvávají nebo mají pouze velmi malou snahu navracet se do původní pozice ve vodním sloupci.

2.4 Indukce reprodukce

Umělý výtěr kapra obecného s inkubací oplozených jiker v líhňařských přístrojích se v rybářském provozu začal uplatňovat a rozšiřovat až po roce 1970 (Krupauer a Kubů, 1985). Metoda hypofyzace ryb, při které dochází k časovému urychlení doby nástupu vrcholné pohlavní zralosti generačních ryb, je však známa již od 30. let 20. století. V Československu se hypofyzace kapra poprvé úspěšně použila v roce 1947 (Krupauer a Kubů, 1985). Aplikace suspenze kapří hypofýzy se postupem let a získaných zkušeností ustálila na v současnosti využívaném dávkování (viz Tabulka 1). Některé rybí líhně dlouhodobě k hormonální stimulaci generačních ryb obou pohlaví aplikují suspenzi syntetického Ovopelu (Das, 2004; distribuce preparátu Interfish Ltd., Maďarsko), jehož velkoobchodní cena je podobná, příp. i nižší než cena kvalitní kapří hypofýzy. Způsob aplikace hypofýzy a Ovopelu shrnuje Tabulka 1, potřeby pro praktickou aplikaci hormonální stimulace pak ukazuje Obrázek 7 a způsob intramuskulární aplikace látek Obrázek 8.

Tabulka 1: Časový a teplotní harmonogram hormonální stimulace kapra obecného, podle Gela a kol. (2009).

Čas od první injekce (hod)	0	12	±22-24
Nasycení O ₂	min. 60 % na odtoku z přípravného bazénu		
Teplota vody u ♀ (°C)	19,5-20,0	20,0-20,5	21,0-22,0
Kapří hypofýza (mg hypofýzy . kg ⁻¹)	0,5	2,5	ovulace zralých jiker
Ovopel	1 ks peletky na 5-10* kg ⁻¹	1 ks peletky kg ⁻¹	ovulace zralých jiker
Teplota vody u ♂ (°C)	19,0-21,0		
Kapří hypofýza (mg hypofýzy . kg ⁻¹)	0,7-1,5	---	odběr spermatu
Ovopel	1 ks peletky na 10 kg ⁻¹	---	odběr spermatu

* dávku 1 **čerstvé** peletky pro 10 kg jikernaček lze použít v případě jistoty dokonalé zralosti a připravenosti všech injikovaných generačních ryb, tzn. spíše v druhé polovině výtěrové sezóny.

Velice dobrých výsledků v poloprovozním experimentu úspěšnosti umělého výtěru jikernaček kapra obecného dosáhl izraelský preparát Dagin (Ramot Ltd of Tel Aviv University, Israel, distribuce Gan Samuel Fish-Hatchery). Tento preparát je distribuován v lyofilizovaném stavu ve formě prášku. Jednotlivé ampule obsahují dávku pro 20 kg nebo 50 kg ryb a v dávce pro 1 kg samice je obsaženo 10 µg GnRH_a a 20 mg metoclopramidu. Před použitím se obsah ampulky doplní příslušným objemem fyziologického roztoku a účinná látka se rozpustí (Kouřil a kol., 2011). Zkušenosti s použitím tohoto preparátu jsou velmi dobré, Kouřil a kol. (2020) uvádí úspěšnost ovulace samic při jednorázovém použití Dagingu 89,5%, u Ovopelu pak 82,4% a při stimulaci nejběžnější metodou pomocí dvou dávek hypofýzy 76,5%. Délka intervalu latence od injekce hormonálního přípravku do provedení umělého výtěru u preparátu Dagin pak je uváděna 16,5 ± 0,4 h (resp. 345 ± 8 h^o) (Kouřil a kol., 2020).



Obrázek 7: Materiál potřebný pro aplikaci hormonální stimulace – třecí miska pro dokonalé rozmělnění aplikované látky, fyziologický roztok, injekční stříkačka s dlouhou jehlou odpovídajícího průměru (foto D. Gela).



Obrázek 8: Intramuskulární aplikace látek k hormonální stimulaci (foto V. Kašpar).

2.5 Odběr pohlavních produktů

V praxi se lze setkat s postupem, kdy jsou nejprve vytírány samice a na vytřené jikry jsou poté vytírání samci. Tento postup se uplatňuje především v případě malých líhní a provozních výtěrů bez nutnosti evidence použitých generačních ryb a nutnosti dodržovat specifické postupy křížení nebo reprodukce kmenových hejn. V takovém případě jsou anestetizované samice odlovovány do látkového vaku vhodné velikosti a močopohlavní papila generačních ryb je prsty kontrolována proti samovolnému uvolňování jiker. Po osušení jsou pak jemným tlakem na břišní dutinu vytírány jikry a to zpravidla způsobem, kdy pracovník fixující rybu v látkovém vaku sedí na židli a jemným tlakem na břišní partie jikernačky vytírá jikry do vhodné suché misky držené dalším pracovníkem líhně. V případě velkých generačních ryb nebo v případě, že relativně velké provozní výtěry jsou zabezpečovány malým počtem pracovníků se lze setkat s postupem, kdy jsou ryby vytírány v poloze na boku položené na stole s molitanovou podložkou – někdy i na stole umístěném v nádrži nebo v těsné blízkosti nádrže, kde byly ryby anestetizovány. Na získané jikry jsou potom přímo vytírání samci a jikry jsou oplozovány. Na jikry získané od jedné jikernačky se používá zpravidla 3–5 mlíčáků a objem spermatu by měl být v rozsahu 2–10 ml na kilogram jiker. V případě vedení provozní evidence se přímo na misku a následně do provozní evidence zaznamenává plemenná příslušnost nebo případně individuální značení generačních ryb.

Daleko častější je však postup, kdy jsou nejprve odebírány pohlavní produkty samců – někdy i s několikahodinovým předstihem před plánovaným výtěrem jikernaček. V takovém případě jsou mlíčáci po anestezii obdobným způsobem fixováni a osušeni, sperma je odstříkáváno do vhodných nádob – kádinek, zkumavek nebo jiných nádob. Na líhni Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod se dlouhodobě osvědčil postup podtlakového odsávání vytíraného spermatu pomocí systému skládajícího se z vodní vývěvy, hadiček s tahem způsobeným podtlakem z vývěvy a vhodných nádob – v našem případě nádob na buněčné kultury uzavřených zátkou s trubičkou pro odsávání spermatu a připojením tahu vývěvy (Obrázek 10). Sperma je v takových nádobách krátkodobě skladováno do samotného použití v chladničce nebo termoizolačním boxu s vrstvou šupinkového ledu. Tímto způsobem odběru lze dokonale předcházet kontaminaci spermatu, v případě odběru spermatu před výtěrem samic lze mikroskopicky pozorovat pohyblivost spermií po aktivaci nebo zaznamenávat pohyb aktivovaných spermií pro přesné hodnocení kvality pomocí systému analýzy obrazu z následných snímků videozáznamu pohybu spermií.

Po odběru všech samců jsou pak vytírány samice, miska se získanými jikrami překrytá vlhkou utěrkou, potravinářskou fólií nebo víkem se umístí do prostředí o teplotě 18–20 °C do jejich zpracování. Pokud jsou vytírány značené ryby a je v průběhu výtěru vedena evidence, potom se vytřené ryby ihned po odběru pohlavních produktů identifikují individuálními značkami, tj. načtením P.I.T. nebo čtením kryogenní značky. Značení ryb je zaznamenáno na nádobu s odebíranými pohlavními produkty permanentním markerem. Poté se ryba umístí do nádrže s čistou vodou o stejné teplotě s provzdušňováním nebo prokysličováním a ryby jsou neustále kontrolovány. Je nutné zajistit co nejvyšší nasycení vody kyslíkem.



Obrázek 9 a 10: Odběr pohlavních produktů (foto V. Kašpar).

2.6 Osemenění a oplození

Pokud jsou pohlavní produkty generačních ryb odebírány a uchovávány odděleně, provádí se osemenění přidáním spermatu z uchovávacích nádob nebo kontejnerů na buněčné kultury podle předem připraveného plánu křížení. Pro provozní kalkulace lze počítat s tím, že 1 g jiker zpravidla obsahuje 700-800 ks jiker. Na osemenění 1 kg jiker je třeba počítat s přidáním 2-10 ml kvalitního spermatu (Obrázek 11), jikry se jemným mícháním stěrkou nebo laboratorní lžičkou promíchají se spermatem a gamety jsou aktivovány přidáním vody ze systému rybí líhně odpovídající přibližně polovině objemu aktivovaných jiker (Obrázek 12). Voda v systému pro inkubaci jiker by měla mít teplotu v rozmezí 19-22 °C. Po přidání vody jsou gamety aktivovány, iniciován je pohyb spermií, který trvá 45–60 s, u jiker dochází aktivací ke kortikální reakci a formování perivitelního prostoru (Linhart, 2004). Jikry jsou po aktivaci jemně míchány a v případě využití konvenčních postupů odlepkování (viz kapitola 2.7) je přibližně po 1 min od oplození přistupováno k eliminaci lepivosti jiker. Jak již bylo zmíněno v úvodu této metodiky, specifickým případem je reprodukce prováděná za účelem obnovy generačního hejna, obnovy genových zdrojů nebo založení testu užitkovosti. V takovém případě je nutné při osemenění a aktivaci jiker postupovat podle zásad popsaných v metodice uchování genových zdrojů (Flajšhans a kol., 2009).



Obrázek 11: Osemenění jiker během provozního výtěru (foto V. Kašpar).



Obrázek 12: Aktivace gamet přidáním vody ze systému rybí líhně (foto V. Kašpar).

2.7 Odlepkování jiker

Jikry ryb jsou obaleny chorionem, který má ochrannou funkci. Chrání vyvíjející se embryo především před mechanickými, chemickými vlivy a bakteriálními nebo plísňovými infekcemi. Kaprovité ryby mají silně lepivé jikry. Lepivost jiker při přirozeném výtěru zabezpečuje přichycení k výtěrovému substrátu, kterým jsou vodní nebo sezonně zaplavené rostliny. Lepivost jiker mají na svědomí glykoproteiny na povrchu jikerného obalu, které jsou hydratovány při prvním kontaktu s vodou a způsobují lepivost jiker. Pro zefektivnění umělé reprodukce kaprovitých ryb a jejich efektivní inkubaci pomocí běžných postupů s využitím různých líhňářských aparátů (Zugské nebo Kannengieterovy lahve) bylo proto nutné vyvinout vhodné postupy pro eliminaci lepivosti jiker. Při inkubaci jiker je nutné předcházet vytváření shluků jiker, které by při nedostatečném prokysličení odumíraly a podléhaly bakteriálním a plísňovým infekcím. Dokonalé odlepkování jiker zvyšuje celkovou efektivitu umělé reprodukce a snižuje náročnost ošetřování jiker během samotné inkubace.

Různé metody odlepkování jiker kaprovitých ryb byly rozvíjeny od šedesátých let minulého století a v dnešní době existuje celá řada metod eliminace lepivosti založených na různých principech a různých látkách. První z používaných metod eliminace lepivosti oplozených jiker byla vyvinuta Woynarovichem (Woynarovich, 1964). Metoda je založena na osemenění a aktivaci roztokem obsahujícím močovinu ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) v koncentraci 3 g.l^{-1} a chlorid sodný (NaCl) v koncentraci 4 g.l^{-1} , tento roztok ředěný 1:1 vodou z líhně slouží k aktivaci gamet a inkubaci oplozených jiker po dobu 1-1,5 h. Následně jsou jikry promývány čistou vodou a přidáván je roztok NaCl o koncentraci 60 g.l^{-1} a zde jsou jikry míchány po dobu 0,5-1 h, poté jsou jikry znovu pomývány a přidán poslední roztok o koncentraci močoviny 85 g.l^{-1} , kde jsou jikry inkubovány a občasné promíchávány po dobu 1-2 h. Celková doba nutná k eliminaci lepivosti jiker Woynarovichovou metodou je až několik hodin, lze ji tedy považovat za velmi zdoluhavou metodu pro použití v dnešní praxi, kdy rybí líheň během jednoho dne reprodukce pracuje s velkým počtem generačních ryb několika plemen, která jsou oplozována odděleně a různými způsoby podle plánovaného cíle.

Modifikovaná Woynarovichova metoda (Woynarovich a Woynarovich, 1980) je založena na oplození jiker v aktivčním roztoku obsahujícím směs 30 g močoviny a 40 g chloridu sodného s 10 l vody z líhně po dobu 1 až 1,5 h. Tímto roztokem se ošetří osemeněné jikry a poté se promyjí vodou a následně jsou inkubovány v roztoku obsahujícím 40 g chloridu sodného a 200 g močoviny v 10 l vody za stálého míchání po dobu 10-15 min a poté občasně míchání po dalších 45 min. Další následné modifikace Woynarovichovy metody pak počítaly s aplikací taninu formou opakované krátké expozice jiker roztoku o koncentraci 15 g.l^{-1} po dobu cca 10 s nebo s opakovaným ponořením do roztoku taninu o koncentraci 5 g.l^{-1} .

Rybí líhně v současné době nejčastěji používají metodu odlepkování jiker kapra založenou na použití suspenze sušeného mléka či emulze (ředění 1:9) běžného plnotučného mléka (Soin, 1976). Tato metoda je založena na obalení jiker vrstvou tuku o tloušťce 2 až 3 μm , která má za následek ztrátu jejich lepivosti. Jikry jsou po aktivaci gamet a oplození částečně promyty a doplněny emulzí či suspenzí mléka a poté intenzivně manuálně míchány nebo míchány v Zugských lahvích pomocí vzduchu přiváděného do inkubačních lahví. Nevýhodou této metody je nutnost dokonale odstranit zbytek suspenze či emulze a skutečnost, že i při relativně dokonalém odstranění zbytku emulze je do odlepkovaných jiker vnášen cizorodý biologický materiál, který může způsobovat problémy při inkubaci v recirkulačních systémech rybích líhní.

Výrazné zkrácení procesu odlepkování jiker bylo očekáváno od optimalizace metod založených na působení enzymů – především alkalázy nebo chymotrypsinu (Linhart a kol., 2003). Nevýhodou použití enzymů je ale nákladnost této metody, nutnost striktně dodržet optimální podmínky skladování enzymu a nutnost sledovat pokles aktivity enzymu v průběhu skladování. Efektivní dávka enzymu by měla být pak ověřována použitím konkrétní výrobní šarže při dodání nového enzymu nebo při použití enzymu, který byl delší dobu skladován. Nesprávným odhadem účinnosti enzymu, který je založen na

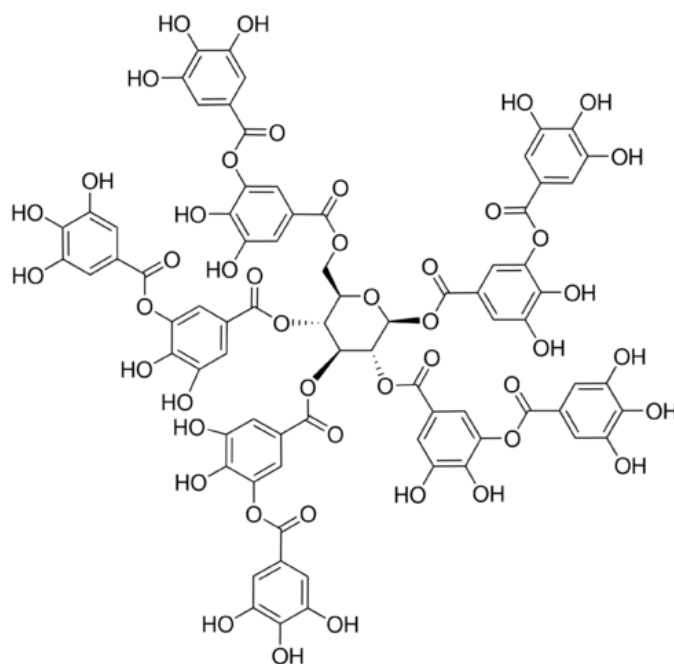
subjektivním hodnocení účinnosti na vzorku jiker, pak dochází ke značným ztrátám v důsledku nedostatečného odlepkování, nebo naopak přílišného naleptání chorionu jiker. Proto je využití této metody v praxi omezeno jen na některé druhy ryb a k rozšíření a použití této metody u kapra v širší míře nikdy nedošlo.

V praxi bylo ověřováno i vystavení jiker roztoku taninu krátce po oplození (Zibiene a kol., 2018). Tato alternativní metoda byla testována ve snaze zkrátit proces odlepkování jiker a jikry byly ihned po oplození vystavovány roztoku taninu o koncentraci 1,3 g.l⁻¹. Při takové aplikaci taninu se jikry okamžitě srazí, po 10 min expozici jen částečně ztratí lepivost a shluky jiker je možné nasadit k inkubaci. Nevýhodou takové aplikace taninu je však skutečnost, že zaznamenaná úroveň líhnivosti dosahovala pouze 38 %.

2.8 Tanin a použití taninu pro odlepkování jiker kapra obecného

Taniny (nebo také třísloviny) jsou látky polyfenolické povahy s vysokou molekulární hmotností (až 3000 g.mol⁻¹) a vznikají jako sekundární metabolity rostlin. Jsou obsaženy v pletivech dvouděložných rostlin z čeledi růžovitých, bobovitých, rdesnovitých, vrbovitých nebo bukovitých – nacházejí se v listech, kůře nebo plodech těchto rostlin, kde mají především ochrannou funkci. Rostliny chrání před hmyzem či spásáním býložravci jejich trpkou a svíravou chutí. Třísloviny získané z různých druhů rostlin jsou v současné době využívány v potravinářském průmyslu nebo zdravotnictví. V rámci potravinářského průmyslu nacházejí uplatnění například při zpracování vína, octa, výrobě piva nebo jako potravinářská aditiva. V lékařství se vyskytují především v přírodních přípravcích k léčbě onemocnění trávicího traktu, zástavě krvácení či dezinfekci. Mají antioxidační, protizánětlivý a antiseptický účinek. Tvoří komplexy s bílkovinami, proto se používají i k léčbě bakteriálních infekcí. Další jejich charakteristickou vlastností je schopnost vytvářet nerozpustné sraženiny s těžkými kovy nebo některými alkaloidy a proto mohou sloužit i jako antidotum při různých otravách. Právě jejich schopnost vytvářet nerozpustné sraženiny s kovy někdy komplikuje jejich použití při ošetřování jiker v případě vysokého obsahu železa ve vodě. V rybářské praxi se tanin používal v modifikovaných postupech původní Woynarovichovy metody odlepkování jiker – většinou k opakovanému krátkému propláchnutí jiker roztokem taninu nebo opakovanému ponoření jiker. Obdobně bylo propláchnutí taninem doporučováno k ošetření jiker proti plísňovým infekcím v průběhu inkubace na Zugských lahvích. V současné době se slabý roztok kyseliny taninové používá především k odlepkování jiker jeseterů (expozice jiker 0,04% roztoku po dobu 40-50 s před odlepkováním pomocí jílu nebo jako opakované promývání stejně koncentrovaným roztokem pro kompletní eliminaci lepivosti jiker).

Tanin je na trh distribuován celou řadou společností dodávajících reagentie pro výzkumné účely, vedle toho lze stejně kvalitní tanin zakoupit ve specializovaných prodejnách pro vinaře nebo prodejnách a e-shopech specializovaných na prostředky pro domácí řemeslné zpracování kůží či dřeva.



Obrázek 13: Strukturální vzorec taninu – kyseliny taninové

Při ověření možnosti použití taninu jako jediné látky k odlepkování jiker kapra byla nejprve směs jiker vzniklá smísením jiker získaných od deseti samic kapra rozdělena na porce po 50 g a tyto porce jiker byly oplozovány v experimentálních podmínkách dokonale simulujících podmínky běžné reprodukce. Po přidání spermatu byly jikry aktivovány vodou z rybí líhně a roztok taninu o koncentraci 1 nebo 2 g.l⁻¹ byl přidáván okamžitě po dokončení procesu oplození (60 s), dále po 5 min nebo 10 min intervalu inkubace jiker ve vodě ze systému líhně nebo emulzi mléka. Oplození 50 g jiker bylo realizováno na laboratorní třepačce (IKA KS260, 150-200 mot/min) a jikry byly v době 1, 5 nebo 10 min po oplození doplněny stejným objemem roztoku taninu o koncentraci 1 g.l⁻¹ nebo 2 g.l⁻¹. Po 2 min inkubace jiker s tímto roztokem taninu byl slit supernatant a objem slitého supernatantu byl nahrazen vodou. Po dalších 3 min třepání byl pohyb laboratorní třepačky zastaven na dobu 5 min a po dalším spuštění pohybu třepačky byla hodnocena subjektivně struktura odlepkovaného množství jiker. Hodnocením makroskopické struktury odlepkovaného materiálu bylo zjištěno, že nejvhodnější je roztok taninu aplikovat až po 10 min přirozeného bobtnání jiker v aktivním médiu.

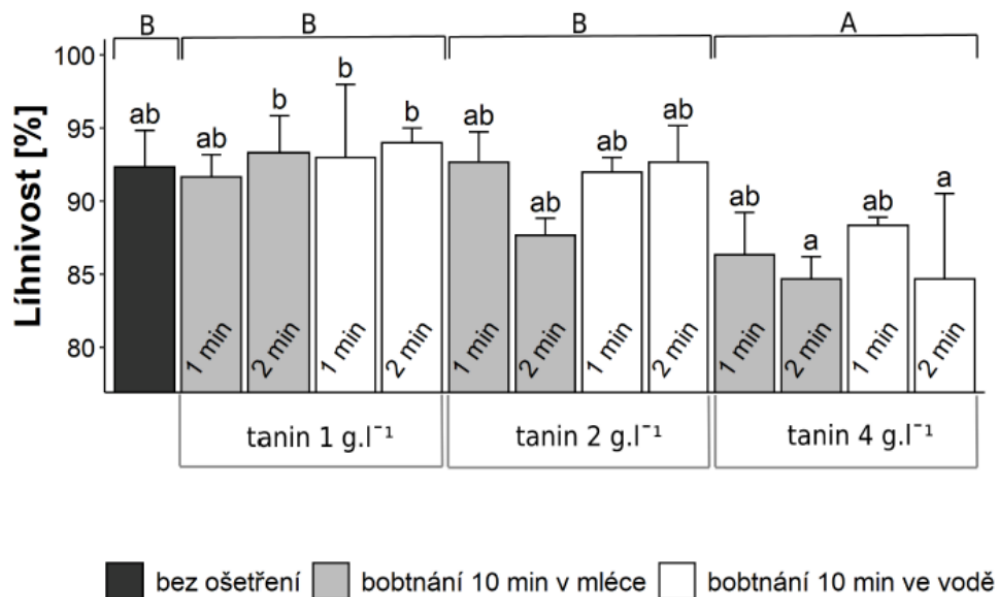
V rámci další optimalizace použití taninu pro odlepkování jiker byla hodnocena líhivost jiker a výskyt deformit plůdku. Znovu byla připravena směs jiker od 10 samic a tato směs byla rozdělena na porce po 50 g. Oplození bylo znovu prováděno na laboratorní třepačce (IKA KS260, 150-200 mot/min). Po dokončení procesu oplození byly jikry při jejich postupném bobtnání doplňovány vodou ze systému líhně a po dosažení 10 min byly odlepkovány roztokem taninu o koncentraci 1, 2 nebo 4 g.l⁻¹, s dobou působení 1 nebo 2 min. Po dokončení procesu odlepkování byl vzorek jiker nasazen k inkubaci do experimentálního inkubátoru. Jako kontrola bylo stejné množství jiker oploženo a odebrané malé množství jiker bylo přilepeno na dno Petriho misek (v jedné vrstvě) a tyto jikry byly nasazeny k inkubaci bez působení taninu nebo jiné látky používané k eliminaci lepivosti. Pro vyhodnocení byl počítán životaschopný rozplavaný plůdek bez makroskopicky zjevných deformit. K ověření vhodné koncentrace a délky působení taninu bylo provedeno 36 oplození (12 variant oplození, 3 opakování každé varianty) a vzorek jiker z každého oplození byl inkubován v experimentálním inkubátoru (Obrázek 14) a určována byla líhivost jiker při ošetření taninem různé koncentrace.



Obrázek 14: Experimentální inkubátor s recirkulovanou vodou ošetřenou UV zářením pro inkubaci jiker při optimalizaci způsobu oplození. (foto V. Kašpar)

U jiker z kontrolní skupiny (bez ošetření) byla zaznamenána líhivost na úrovni $92,2 \pm 2,5$ % značící vysokou kvalitu jiker použitých k experimentálnímu ověření efektu koncentrace taninu. V rámci experimentálního ověření vlivu koncentrace taninu byla zaznamenána průměrná líhivost jiker od $84,4 \pm 6,2$ % při aplikaci taninu v koncentraci 4 g.l^{-1} až po líhivost na úrovni $93,8 \pm 1,2$ % při působení taninu o koncentraci 1 g.l^{-1} po dobu 2 min. Při určování líhivosti nebyl makroskopicky zaznamenán výskyt deformovaného plůdku u 36 variant experimentálního oplození.

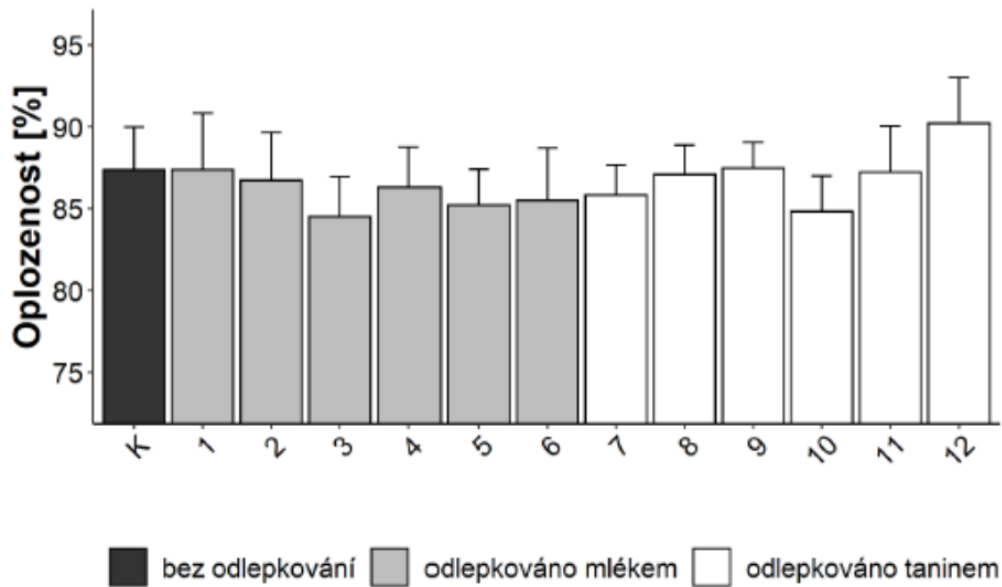
Na data popisující % líhivosti byla uplatněna transformace (*Arcsin*) a analýzou variance (ANOVA) byly určovány rozdíly na hladině významnosti $P=0,05$ a post-hoc analýza byla provedena Tukey HSD testem. K vyhodnocení byl použit statistický software R (verze 4.0.1). Statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny mezi kontrolou a žádnou z metod odlepkování a při porovnání všech kombinací byly nalezeny signifikantní rozdíly jen mezi některými experimentálními kombinacemi, v grafu na Obrázku 15 znázorněno indexy a, ab, b. Na hladině významnosti $P=0,05$ byl dále testován vliv jednotlivých faktorů, jako je médium (mléko, voda), koncentrace ($1, 2$ nebo 4 g.l^{-1}) a délky procesu odlepkování (1 nebo 2 min). Tato analýza neprokázala vliv média na celkovou líhivost jiker, odhalila však efekt koncentrace taninu, kdy použití taninu o koncentraci 4 g.l^{-1} vyústilo v signifikantně nižší líhivost ošetřených jiker. Získané výsledky jsou vizualizovány v grafu na Obrázku 15 a zjištěné statisticky signifikantní rozdíly jsou pak zvýrazněny indexy (A, B). Pro ověření účinnosti metody v podmínkách provozní praxe proto byla zvolena koncentrace taninu 2 g.l^{-1} a doba expozice 2 min, která neměla vliv na celkovou líhivost jiker a byla charakteristická i optimální strukturou odlepkovaných jiker.



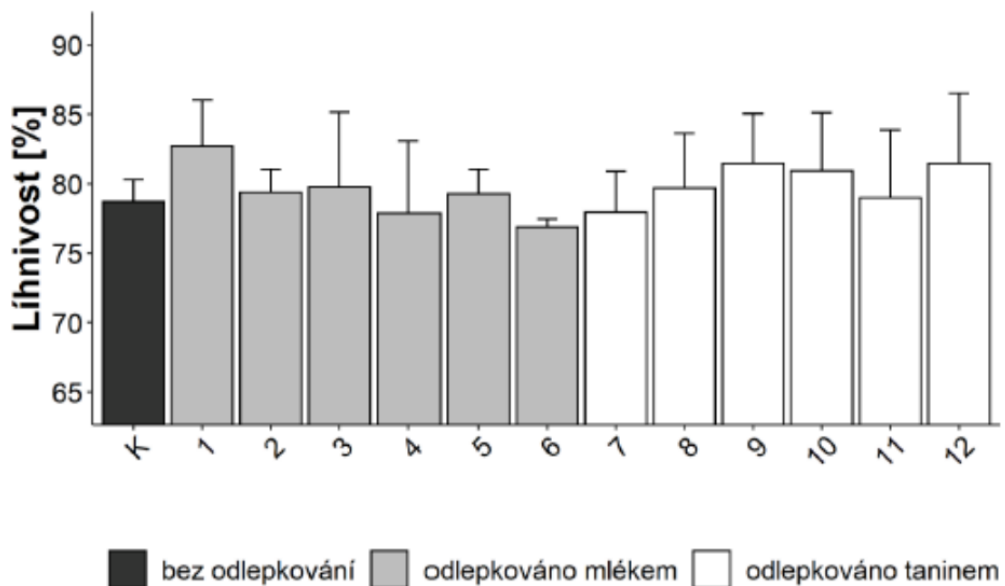
Obrázek 15: Líhivost jiker vystavených roztoku taninu o koncentraci 1, 2 a 4 g.l⁻¹.

Po ověření dílčích částí postupu byla v provozní praxi ověřována účinnost odlepkování jiker kapra pomocí taninu v provozních podmínkách rybí líhně a v porovnání s konvenčním postupem odlepkování, který je založen na obalení jiker kapénkami tuku z emulze mléka. Určovány byly provozní parametry – úroveň oplozenosti 24 h po aktivaci gamet a líhivosti jiker. Rovněž byla dokumentována struktura povrchu jiker po 24hodinové inkubaci v Zugských lahvích zásobovaných vodou z recirkulačního systému. Z jiker získaných od 12 samic byla vytvořena směs, která byla rozdělena na 12 porcí o hmotnosti 800 g. Šest porcí jiker bylo oploženo a odlepkováno pomocí standardní metodiky (emulze mléka, ředění 1:9, doba působení 60 min při ručním míchání), dalších 6 porcí jiker bylo odlepkováno způsobem založeným na předchozích zjištěních. Jikry byly ponechány v aktivační vodě a za postupného doplňování vody opatrně míchány. Po 10 min od aktivace se jikry pozvolna a za stálého míchání doplnily předem připraveným roztokem taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ tak, aby objem jiker v roztoku taninu byl v poměru 1:1. Po 30 s expozice byl odstraněn supernatant a doplněn novým roztokem taninu. Postup byl opakován ještě 3x. Po celkové době působení taninu v trvání 2 min byly jikry propláchnuty a doplněny vodou z líhně. Jikry byly nasazeny k inkubaci do Zugských lahví v recirkulačním systému. Padesátigramová porce jiker pak byla opložena a malé množství jiker (do 500 ks) bylo přilepeno na Petriho misky jako kontrola kvality gamet bez jakéhokoliv odlepkování a tyto misky byly nasazeny do experimentálního inkubátoru pro určení oplozenosti a líhivosti jiker bez ošetření. 24 h po oplození byl skleněnou trubičkou z inkubačních lahví 3x odebrán vzorek jiker k určení oplozenosti, vzorek jiker byl po určení oplozenosti nasazen k inkubaci do experimentálního inkubátoru k určení líhivosti ošetřovaných jiker. Při statistickém zpracování byla na data popisující % oplozenosti a líhivosti uplatněna transformace (*Arcsin*) a analýzou variance (ANOVA) byly určovány rozdíly na hladině významnosti $P=0,05$. K vyhodnocení byl použit statistický software R (verze 4.0.1). Kontrolní oplození jiker bez odlepkování vykazovala relativně vysokou úroveň oplozenosti ($87,3 \pm 2,6$ %) a líhivosti ($78,6 \pm 1,6$ %) značící vysokou kvalitu jiker použitých pro ověření postupu v provozních podmínkách. Jak je znázorněno na Obrázku 16, jednotlivá opakování postupu založeného na aplikaci taninu (2 g.l⁻¹, 2 min trvání) dosáhla oplozenosti v intervalu $84,8 \pm 2,2$ % až $90,2 \pm 2,8$ % a líhivost se

pohybovala v intervalu $77,9 \pm 2,9$ % až $81,45 \pm 5,0$ %, jak je znázorněno Obrázku 17. Odlepkování pomocí emulze mléka pak dosáhlo oplozenosti v intervalu $84,4 \pm 2,5$ % až $87,4 \pm 3,5$ % a líhivosti v intervalu $76,9 \pm 0,6$ % až $82,7 \pm 3,3$ %. Při porovnání obou metod odlepkování nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v oplozenosti ani líhivosti.



Obrázek 16: Oplozenost jiker v provozním ověření účinnosti taninu na odlepkování, porovnání jiker odlepkovaných pomocí emulze mléka a jiker vystavených roztoku taninu o koncentraci 2 g.l^{-1} .



Obrázek 17: Líhivost jiker v provozním ověření účinnosti taninu na odlepkování, porovnání jiker odlepkovaných pomocí emulze mléka a jiker vystavených roztoku taninu o koncentraci 2 g.l^{-1} .

Výše popsané experimenty realizované na Genetickém rybářském centru Fakulty rybářství a ochrany vod v roce 2021 a postup odlepkování jiker pomocí taninu pak byl používán v roce 2022 a 2023 jako jediný postup odlepkování jiker kapra obecného. Zkušenosti získané v rámci dvou reprodukčních sezon jsou pak shrnuty v následujícím postupu.

PRAKTICKÝ NÁVOD PRO ODLEPKOVÁNÍ JIKER POMOCÍ TANINU

1. Příprava koncentrovaného roztoku kyseliny taninové. Navážíme 20 g prášku kyseliny taninové (např. Sigma-Aldrich, objednáací číslo 1401-55-4) a převedeme do vhodné lahve nebo jiné nádoby o objemu 0,5-1 l a doplníme teplou vodou. Intenzivním třepáním dokonale rozpustíme.
2. Koncentrovaný roztok z lahve doplníme vodou ze systému rybí líhně (20°C) do celkového objemu 10 l roztoku a tento roztok bude sloužit jako zásobní roztok pro odlepkování jiker.
3. Na jikry nanese odpovídající množství spermatu a gamety aktivujeme přidáním aktivační vody v objemu odpovídajícím polovině objemu jiker, dokonale promícháme pro oplození jiker v celém objemu misky.
4. Oplozené jikry mícháme nejprve v aktivační vodě, poté pomalu doplňujeme vodu v misce tak, aby jikry byly sotva zalaty a mohly bobtnat. Jikry neustále mícháme (manuálně, na třepačce či vzduchem) a vodu pozvolna doplňujeme.
5. Po 10 min od aktivace jiker přidáme do jiker pozvolna roztok taninu, nejprve zásobní roztok naředěný na polovinu koncentrace (zásobní roztok 1:1 s vodou ze systému, finální koncentrace 1 g.l⁻¹) a pozvolna přidáme množství shodné s objemem jiker. Po 30 s míchání supernatant slejeme.
6. Po tomto prvním promytí jiker doplníme odlepkované jikry připraveným roztokem taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ a v množství shodném s objemem jiker, promícháme a po uplynutí 30 s znovu slejeme supernatant.
7. Znovu doplníme zásobní roztok taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ a jikry mícháme tak, aby celkové působení taninu bylo 2-3 min. Pokud je to nutné, můžeme jikry vystavit působení roztoku taninu až na 6-8 min bez vlivu na oplozenost nebo líhivost jiker. Delší působení zpravidla není třeba.
8. Po uplynutí 2-3 min působení taninu propláchneme jikry čistou vodou z líhně a nasadíme jikry k inkubaci na lahve.
10. Seřídíme průtok vody na lahvích tak, aby v počáteční fázi byl intenzivnější a způsoboval víření jiker v celé jejich mase, poté intenzitu průtoku snížíme na jemné převalování inkubovaných jiker v lahvi.



Obrázek 18: Kontrolované bobtnání jiker před ošetřením (foto V. Kašpar).



Obrázek 19: Jikry odlepkovávají pomocí taninu – odlepkovací roztok se mléčně zakaluje (foto V. Kašpar).



Obrázek 20: Promývání jiker před nasazením k inkubaci (foto V. Kašpar).

V některých specifických případech se můžeme setkat s využitím roztoků pro uchovávání spermatu. Tyto roztoky obsahují ionty, které ovlivňují způsob bobtnání jiker a této skutečnosti je tedy nutné upravit i způsob použití taninu pro odlepkování jiker. Nejčastěji je možné setkat se s roztoky označovanými jako ASP (2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 40 mM KCl , 100 mM NaCl , 20 mM Tris ; pH 7.5 and 310 mOsm kg^{-1}) nebo modifikovaný roztok podle Cejko (Cejko, 2019; 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 20 mM Tris , 110 mM NaCl , 40 mM KCl , pH 7.5 and 310 mOsm/kg). V průběhu reprodukčních sezon 2022 a 2023 byla ověřována použitelnost postupu odlepkování jiker s využitím taninu i pro oplození spermatem skladovaným v roztocích pro krátkodobé uchování. Získané zkušenosti jsou pak shrnuty v následujícím praktickém postupu.

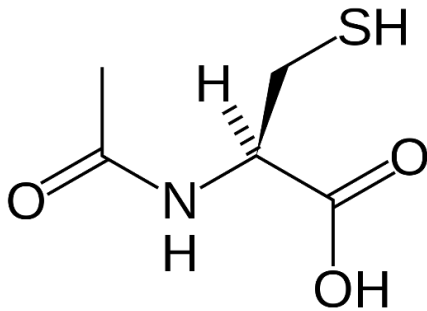
PRAKTICKÝ NÁVOD PRO ODLEPKOVÁNÍ JIKER POMOCÍ TANINU PŘI VYUŽITÍ SPERMATU V ROZTOCÍCH PRO KRÁTKODOBÉ UCHOVÁNÍ

1. Příprava koncentrovaného roztoku kyseliny taninové. Navážíme 20 g prášku kyseliny taninové (např. Sigma-Aldrich, objednávací číslo 1401-55-4) a převedeme do vhodné lahve nebo jiné nádoby o objemu 0,5-1 l a doplníme teplou vodou. Intenzivním třepáním dokonale rozpustíme.
2. Koncentrovaný roztok z lahve doplníme vodou ze systému rybí líhně (20°C) do celkového objemu 10 l roztoku a tento roztok bude sloužit jako zásobní roztok pro odlepkování jiker.
3. Na jikry nanese odpovídající množství spermatu a gamety aktivujeme přidáním aktivačního roztoku nebo zředěním roztoku pro uchovávání jiker (ASP, Cejko) v ředění doporučeném pro příslušný typ roztoku, dokonale promícháme pro oplození jiker v celém objemu misky.

4. Oplozené jikry mícháme nejprve v aktivační vodě, poté pomalu doplňujeme vodu v misce tak, aby jikry byly sotva zalité a mohly bobtnat. Jikry neustále mícháme (manuálně, na třepačce či vzduchem) a vodu pozvolna doplňujeme.
5. Po 15 min od aktivace jiker přidáme do jiker pozvolna roztok taninu, nejprve zásobní roztok naředěný na polovinu koncentrace (zásobní roztok 1:1 s vodou ze systému, finální koncentrace 1 g.l⁻¹) a pozvolna přidáme množství shodné s objemem jiker. Po 30 s míchání supernatant slejeme.
6. Po tomto prvním promytí jiker doplníme odlepkované jikry připraveným roztokem taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ a množství shodném s objemem jiker, promícháme a po 30 s znovu slejeme supernatant.
7. Znovu doplníme zásobní roztok taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ a jikry mícháme tak, aby celkové působení taninu bylo 2-3 min. Pokud je to nutné, můžeme jikry vystavit působení roztoku taninu až na 6-8 min bez vlivu na oplozenost nebo líhivost jiker. Delší působení zpravidla není třeba.
8. Po uplynutí 2-3 min působení taninu propláchneme jikry čistou vodou z líhně a usadíme jikry k inkubaci na lahve.
10. Seřídíme průtok vody na lahvích tak, aby v počáteční fázi byl intenzivnější a způsoboval víření jiker v celé jejich mase, poté intenzitu průtoku snížíme na jemné převalování inkubovaných jiker v lahvi.

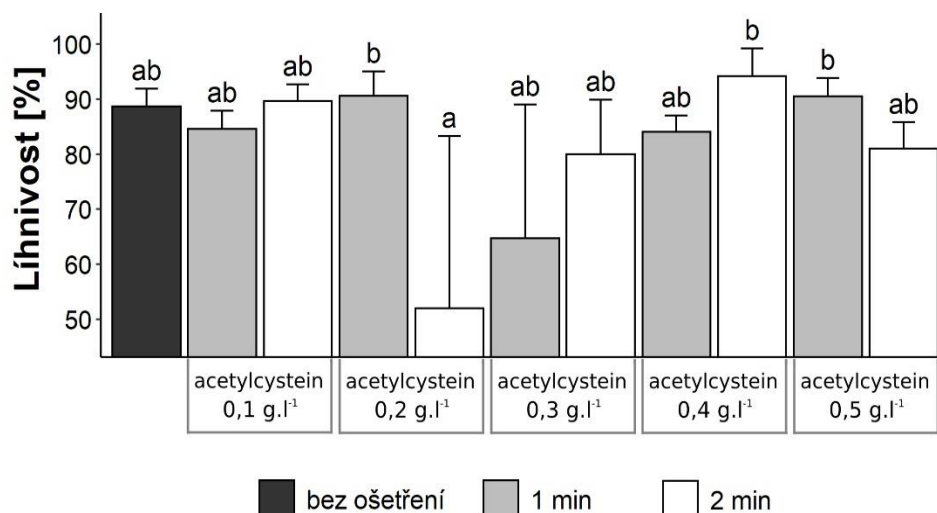
2.9 Acetylcystein a použití

Acetylcystein (také *N*-acetylcystein) se skládá z aminokyseliny L-cysteinu a acetylové skupiny. Používá se ve farmacii lékařství jako látka s významným mukolytickým a antioxidačním účinkem. Je součástí celé řady léčiv používaných k léčbě vlhkého kašle nebo zahlnění cest dýchacích. Mukolytický účinek látky je založen na narušování disulfidových můstků v bílkovinách, kdy dochází k zvyšování tekutosti hlenu, a tuto vlastnost acetylcysteinu lze využít i pro odlepkování jiker ryb. Na trh je dodáván řadou společností, pro potřeby optimalizace metodiky použití acetylcysteinu byl ověřován účinek látky dodávané společností Sigma Aldrich (objednací číslo A7250-100G).



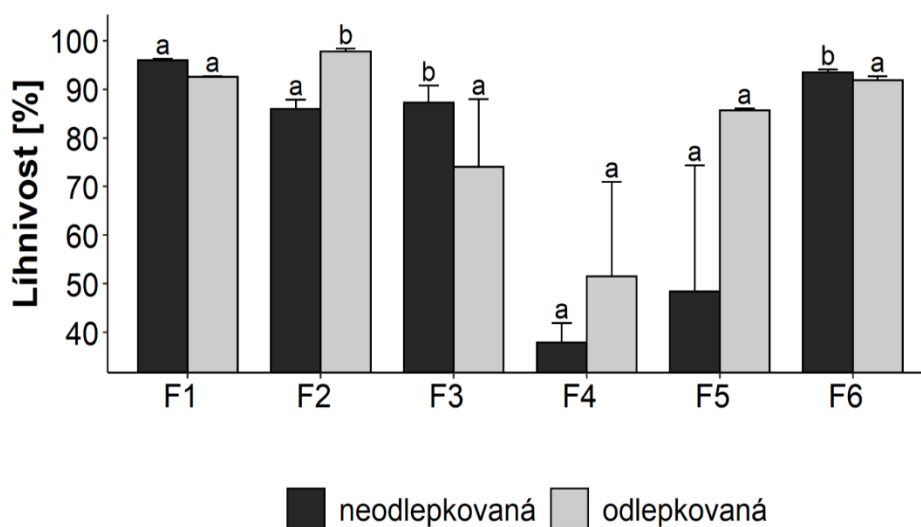
Obrázek 21: Strukturální vzorec acetylcysteinu.

Použitelnost acetylcysteinu k odlepkování jiker kapra byla testována způsobem obdobným tomu, který je popsán výše pro optimalizaci použití taninu. V tomto případě byly testovány koncentrace acetylcysteinu 0,1-0,5 g.l⁻¹ po dobu expozice 1 nebo 2 min. Směs jiker vzniklá sloučením jiker získaných od deseti samic kapra a následně rozdělena na porce po 50 g. Tyto porce jiker byly oplozovány v experimentálních podmínkách dokonale simulujících podmínky běžné reprodukce. Po přidání spermatu byly jikry aktivovány vodou z rybí líhně a roztokem acetylcysteinu o koncentraci 0,1-0,5 g.l⁻¹. Po ošetření byly jikry inkubovány v experimentálním inkubátoru a sledována byla jejich líhivost. Na data popisující % líhivosti byla uplatněna transformace (*Arcsin*) a analýzou variance (ANOVA) byly určovány rozdíly na hladině významnosti $P=0,05$ a post-hoc analýza byla provedena Tukey HSD testem. K vyhodnocení byl použit statistický software R (verze 4.0.1). Líhivost popisuje graf (Obrázek 22).



Obrázek 22: Graf – porovnání líhivosti jiker oplozených a následně ošetřených acetylcysteinem o koncentraci 0,1 – 0,5 g.l⁻¹.

Pro poloprovozní ověření použitelnosti acetylcysteinu byla vybrána koncentrace $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ a ověřována byla líhivost jiker ošetřených touto látkou, a to porovnáním s líhivostí jiker neošetřených. Vytřeno bylo 6 jikernaček, porce jiker o hmotnosti 800 g byly oplozeny a po oplození byl reprezentativní vzorek jiker přilepen k Petriho misce a nasazen k inkubaci do experimentálního inkubátoru. Po 10 min kontrolovaného bobtnání jiker byly tyto porce jiker odlepkovány pomocí acetylcysteinu o koncentraci $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ s dobou působení 2 min a vzorek jiker byl poté znovu nasazen do experimentálního inkubátoru pro následné určení líhivosti. Zbytek stejným způsobem odlepkovaných jiker byl inkubován provozním způsobem na Zugských lahvích. Líhivosti kapřího plůdku získaného z neodlepkovaných a acetylcysteinem odlepkovaných jiker pocházejících od šesti různých jikernaček (F1–F6) popisuje graf (Obrázek 23). Statistická hodnocení dat byla uskutečněna zvlášť podle příslušnosti k jednotlivým jikernačkám. Normalita dat byla posuzována Shapiro-Wilkovým testem, homogenita rozptylů byla testována Fisherovým F-testem. V případě splnění předpokladů normality byla významnost rozdílů mezi různě ošetřenými skupinami hodnocena dvouvýběrovým t-testem (F2, F3, F5, F6), při narušení předpokladu normality bylo porovnání provedeno s použitím neparametrického Mann-Whitneyova testu (F1, F4). Všechny analýzy uskutečněny ve statistickém softwaru R (4.0.1), zvolená hladina významnosti $\alpha=0,05$.



Obrázek 23: Graf – porovnání líhivosti jiker šesti samic oplozených a nasazených k experimentální inkubaci a jiker ošetřených acetylcysteinem.

PRAKTICKÝ NÁVOD PRO ODLEPKOVÁNÍ JIKER POMOCÍ ACETYLCYSTEINU

1. Příprava odlepkovacího roztoku – navážku acetylcysteinu (např. Sigma-Aldrich, A7250-100G) 4 g jemným třepáním rozpustíme v malém množství vody. Rozpuštěný acetylcystein následně doplníme vodou ze systému rybí líhně (20°C) do celkového objemu 10 l roztoku a tento roztok bude sloužit jako zásobní roztok pro odlepkování jiker.

3. Na jikry nanese odpovídající množství spermatu a gamety aktivujeme přidáním vody v objemu odpovídajícím polovině objemu jiker. Pro dokonalé oplození promícháme v celém objemu misky.
4. Oplozené jikry mícháme nejprve v aktivační vodě, poté dle potřeby pomalu doplňujeme vodu v misce tak, aby jikry byly sotva zality a mohly přirozeně bobtnat. Jikry neustále mícháme (manuálně, na třepačce).
5. Po 10 min od aktivace gamet čistou vodou postupně aplikujeme připravený roztok acetylcysteinu v množství shodném s objemem ošetřovaných jiker. Po 30 s míchání supernatant slejeme.
6. Po tomto prvním promytí jiker doplníme zpracovávané jikry znovu odlepkovacím roztokem v koncentraci dle bodu 1 a postup opakujeme 3x tak, aby celková doba expozice použité látky na jikry byla v rozmezí 2 – 2,5 min. Pokud je to nutné, můžeme jikry vystavit působení roztoku až na dvojnásobnou dobu bez námi zaznamenaného negativního vlivu na následnou oplozenost nebo líhivost takto ošetřených jiker.
7. Poté jikry propláchneme čistou vodou z líhně a nasadíme k inkubaci do Zugských lahví. Seřídíme průtok vody na lahvích tak, aby v počáteční fázi vývoje byl intenzivnější a způsoboval víření jiker v celé jejich masě, poté intenzitu průtoku snížíme na jemné převalování inkubovaných jiker v lahvi.

2.10 Inkubace jiker

V provozní praxi jsou v současné době k inkubaci jiker kaprovitých ryb nejčastěji používány Zugské (Weisovy) lahve o objemu 7-10 l. Výjimečně se k inkubaci jiker používají další typy lahví – Chasseovy nebo Kannengieterovy lahve. Jikry by měly pro optimální vývoj být inkubovány ve vodě o teplotě 18-22 °C a průtok v lahvích by měl být nastaven tak, aby docházelo k pozvolnému přelévání jiker.

V průběhu inkubace je nutné jikry čistit odsáváním mrtvých jiker – bez ohledu na to, zda jsou jikry inkubovány v systému průtočné nebo recirkulační líhně. Provozní oplozenost jiker je možné stanovovat po 1,5 dni inkubace, kdy neoplozené nebo mrtvé jikry zbělají. Oplozenost je možné určovat počítáním vzorku jiker v reálném čase nebo dokumentovat fotografováním pro pozdější stanovení úrovně oplozenosti. Neoplozené a mrtvé jikry v průběhu inkubace při správně seřízeném průtoku vystoupají do horní části masy jiker a je žádoucí je v průběhu inkubace odstraňovat odsátím hadičkou tak, aby v inkubačních aparátech nedocházelo k rozvoji plísní *Saprolegnia* či bakterií (především *Aeromonas* a *Pseudomonas*). K prevenci a tlumení plísní je žádoucí vodu v recirkulačních systémech ošetřovat UV zářením či ozonizací (Litved, 2003) nebo jikry vystavovat krátkodobým koupelím v Jodisolu v koncentraci 5–10 ml.l⁻¹ a délce koupele 2 min (Kouřil a Hamáčková, 1998). V recirkulačních líhních je zpravidla odpovídající množství Jodisolu k ošetření jiker nanášeno přímo do inkubačních lahví se zastaveným přívodem vody, po uplynutí optimální doby expozice jsou pak inkubační lahve přeplavovány tak, aby voda z lahví nebyla odváděna do systému. Případně je možné použít i roztok Acriflavinu, zejména pro experimentální inkubace malého množství jiker (účinek látky je závislý na intenzitě osvětlení).



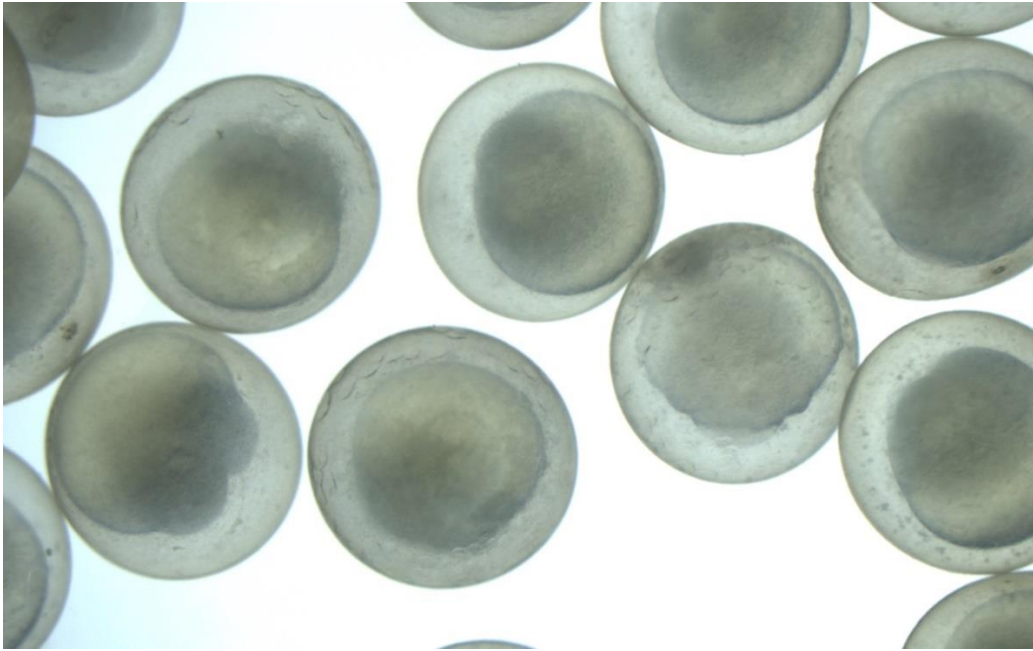
Obrázek 24: Recirkulační rybí líheň připravená pro umělou reprodukci kapra (foto V. Kašpar).



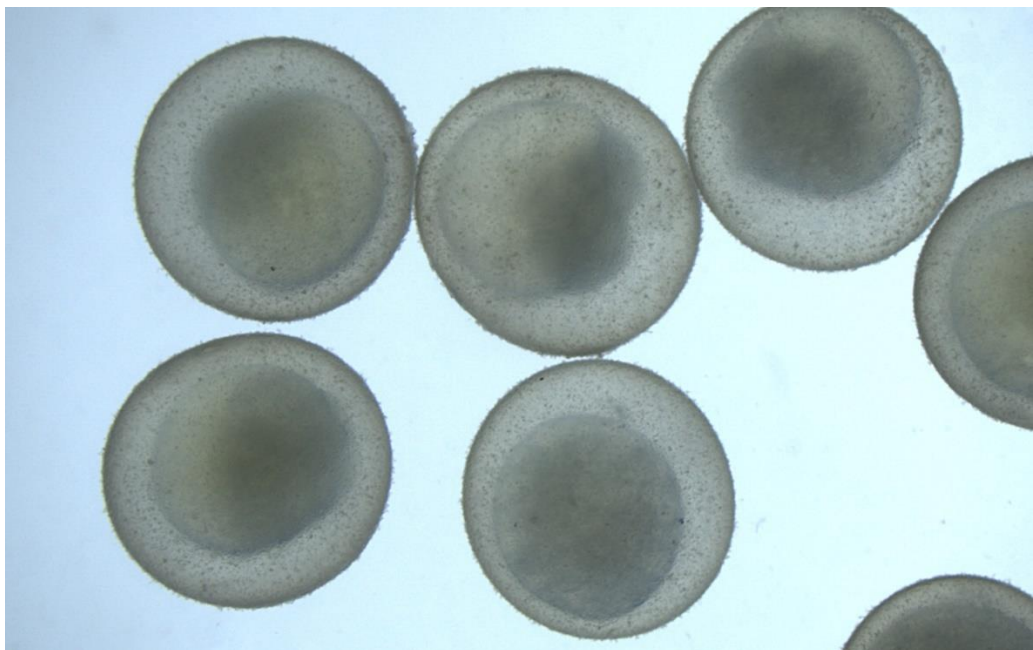
Obrázek 25: Odlepkované jikry nasazené k inkubaci (foto V. Kašpar).

Při optimalizaci postupu odlepkování jiker byly jikry odlepkované taninem a jikry odlepkované standardním postupem pomocí emulze mléka inkubovány v systému recirkulační rybí líhně Genetického rybářského centra. Jikry byly po 24 h inkubace pozorovány a dokumentovány fotografováním pod binolupou (Leica, Německo). Obrázek 26 a Obrázek 27 pak umožňuje přímé porovnání povrchu jiker ošetřených různými postupy. Jikry ošetřené taninem jsou na povrchu hladší a nemají tendence zachytávat drobné částičky nečistot ze systému rybí líhně. Dále byly jikry vzorkovány po 24 h inkubace pro přípravu histologických preparátů s využitím komerčně dostupného kitu (JB-4

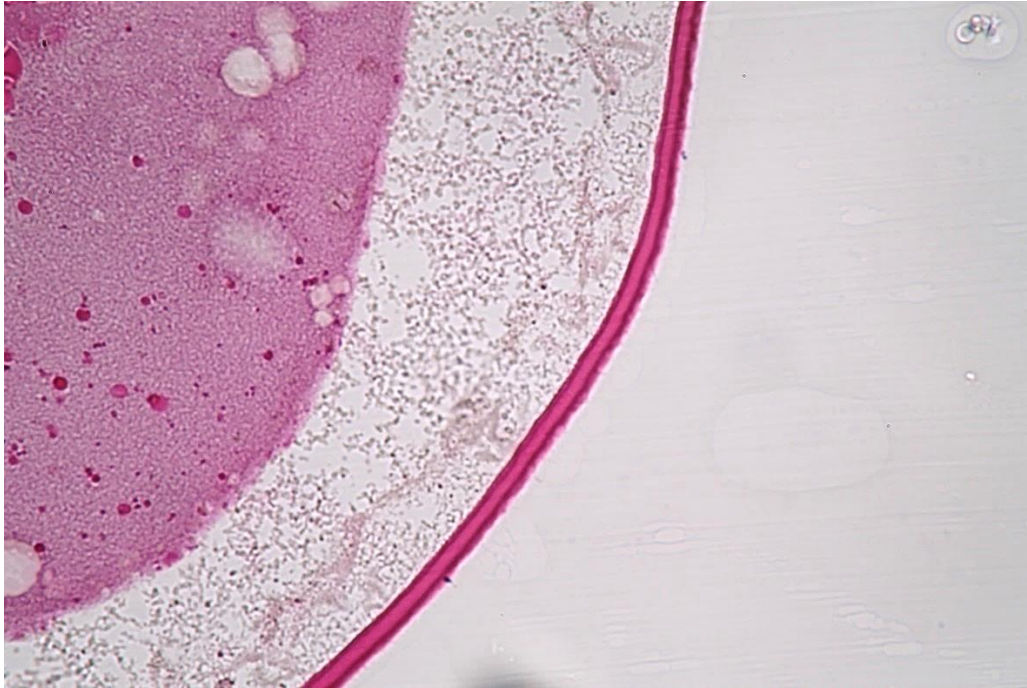
Embedding Kit, Sigma-Aldrich, USA). Mikrotomem pak byly připraveny řezy o tloušťce 5 μm a po obarvení byly tyto řezy pozorovány pod mikroskopem. Obrázky 28 a 29 dokumentují rozdílnou strukturu povrchu jiker po ošetření konvenčním postupem pomocí mléka a taninem.



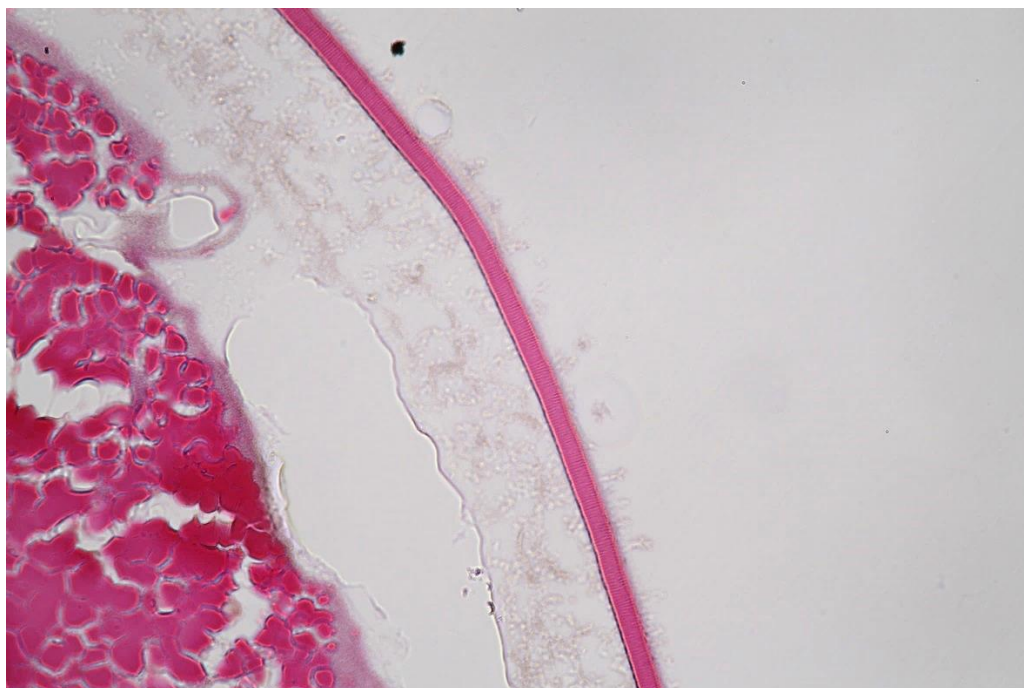
Obrázek 26: Povrch jiker ošetřených taninem po 24 h inkubace v systému recirkulační líhně (foto R. Franěk).



Obrázek 27: Povrch jiker ošetřených mlékem po 24 h inkubace v systému recirkulační líhně, kdy i po velmi krátké době je patrné značné pokrytí jikerného obalu částicemi (foto R. Franěk).



Obrázek 28: Histologický řez – povrch jiker ošetřených taninem po 24 h inkubace v systému recirkulační líhně (foto V. Kašpar).



Obrázek 29: Histologický řez – povrch jiker ošetřených mlékem po 24 h inkubace v systému recirkulační líhně (foto V. Kašpar).

Plůdek kapra se obvykle kulí po uplynutí 70denních stupňů (d°), v závislosti na průběhu teploty vody po dobu vývoje oplozených jiker. Nástup kulení prozradí pěna tvořící se na hladině vody a pozorovatelné menší množství již vykuleného plůdku (cca 5 % objemu jiker) v lahvi. Líhnutí je možné uspíšit zvýšením teploty vody v systému líhně nebo krátkodobým zastavením přítoku vody do inkubační lahve, kdy dojde k tzv. “přidušení embrya” a zrychlenému vykulení celého objemu jiker. Poté je vykulený plůdek odsáván hadičkou do vhodné nádoby, vyčištěn od zbytků rozpadlých jikerných obalů a nasazován do připravených inkubátorů nebo kolíbek pro následné období endogenní výživy. V průtočných líhních pak může být přirozeně se kulící plůdek postupně přeplavován přepadem vody z inkubačních lahví s nasazenými gumovými límci např. pomocí plastových trubek do vhodných uhelonových kolíbek ve žlabech (oka uhelony 0,25-0,35 mm).

2.11 Období endogenní výživy

Vykulený váčkový plůdek se v přirozeném prostředí zavěšuje na vodní rostliny nebo další materiály a takto zavěšený setrvává obvykle 3-5 dní. V prostředí rybí líhně je možné plůdek po vykulení přeplavovat nebo převést do vhodných uhelonových kolíbek ve žlabech, beden s přívodem vody nebo inkubačních aparátů původně určených pro inkubaci jiker býložravých ryb. V případě přeplavování váčkového plůdku do kolíbek nebo převádění do beden pro rozplavání je bezpodmínečně nutné poskytnout plůdku vhodný materiál pro zavěšení – čisté listy ostřice, chrastice, rákosu, větve břízy nebo vrby. Jinak by došlo k nahromadění plůdku na dně, kde by hynul v důsledku udušení. V případě převádění do inkubačních aparátů pro býložravé ryby (nejčastěji objem 200 nebo 225 l) je plůdek v aparátu nadnášen krouživým pohybem vody v celém sloupci aparátu. U těchto inkubátorů je přívod vody umístěn doprostřed kónicky tvarovaného dna a proud vody je do inkubátoru vpouštěn drážkami tak, aby docházelo k dokonale krouživému pohybu vody v inkubátoru, který jemně míchá nasazovaným plůdkem, nedochází však k jeho poškozování. Voda v horní části inkubátoru přepadá přes uhelonovou síťovinu, kterou je nutné opakovaně čistit. Do jednoho inkubátoru je běžně nasazováno 2-2,5 milionu kusů plůdku. V inkubátoru je nasazovaný plůdek nejprve u dna, podle rovnoměrného rozmístění plůdku ve sloupci vody je pak možné indikovat kompletní rozplavání plůdku. Plůdek je v této době vyživován žloutkovým váčkem, vyčerpáním zásob žloutkového váčku zmenšuje jeho objem a zároveň tím zmenšuje plochu Cuvierova krevního splavu – rozvětvených cév na jeho předním okraji. Okysličování krve tak z těchto cév přechází na rozvětvené cévy v oblasti hřbetní ploutve a cévy obklopující vznikající trávicí trakt. Poté se již objevuje žaberní aparát, který je od rozplavání hlavní strukturou zabezpečující dýchání. Plůdek po rozplavání přechází na exogenní výživu, a to lze jednoduše indikovat – plůdku je experimentálně podávána suspenze vařeného vaječného žloutku pasírovaná přes velmi jemný uhelon. Nedoporučuje se však podávat plůdku takovou výživu déle než 1-3 dny, a to především z důvodu nevhodného složení vaječného žloutku.



Obrázek 30: Inkubační přístroj pro jikry býložravých ryb, používaný také pro rozplavání plůdku kapra obecného (foto D. Gela).

2.12 Počítání váčkového plůdku, expedice, transport a nasazení

Váčkový plůdek kapra se obvykle rozplave po 80-90 d° od vykulení a poté může být připraven k transportu nebo k vysazování do plůdkových výtažníků. Počítání váčkového plůdku se obvykle provádí objemovou metodou, kdy je plůdek ze odchovného sila loven jemnou uhelonovou sítkou do manipulační nádoby s přesně určeným objemem vody. Poté je v nádobě plůdek jemně rozmíchán a následně je odebráno několik menších odměrek – znovu o známém objemu. Po určení počtu kusů v odměrce nebo několika odměrkách je přepočten plůdek v celkovém objemu manipulační nádoby nebo případně odebíraný objem pro nasazení do konkrétních rybníků nebo balení k expedici jednotlivým zákazníkům.

Na některých rybích líhních je možné setkat se s praxí, kdy je určován počet jiker v inkubačních lahvích počítáním jiker v malém objemu a poté dopočítáván pro jednotlivé aparáty, tj. způsobem analogickým

k počítání plůdku. Tato metoda bývá uplatňována zejména v případech, kdy je plůdek přirozeným způsobem po kulení přeplavován z inkubačních lahví do uhelonových kolébek k nasazení.

Vhodným způsobem balení pro transport je použití dvojitého PE nebo PVC pytlů, přičemž vnitřní pytel pro kontakt s plůdkem má zatavením materiálu PVC zhotovené zakulacené rohy. Voda z inkubačního systému v objemu 10-15 l je dostatečným objemem pro transport 50-200 tis kusů plůdku na běžné vzdálenosti (po ČR) v případě plnění 50 l pytlů kyslíkem (. V průběhu transportu je vhodné zabezpečit stále podmínky, nemělo by docházet ke změnám teploty například v důsledku nadměrného vystavení zabalených pytlů přímému slunečnímu záření při samotné expedici plůdku nebo transportu.

Plůdek kapra je možné vysazovat, pokud teplota vody neklesá pod 12 °C a nejsou očekávány výkyvy teploty nebo přívalové srážky, které by mohly ovlivnit efektivitu vysazení do konkrétních rybníků. Při nevhodném průběhu teplot a extrémních výkyvech počasí je možné plůdek po rozplavání ještě několik dní (3-5 dní) držet v systému rybí líhne při teplotě 16-18 °C do odloženého vysazení do plůdkových výtazníků. Ty se napouštějí vodou přibližně týden před plánovaným vysazením, aby v rybnících došlo k optimálnímu rozvoji velikostně a druhově vhodné přirozené potravy.

2.13 Závěr

Správně prováděná umělá reprodukce kapra obecného je zcela zásadní pro získání požadovaného množství kvalitního plůdku pro komerční podniky, místní organizace, zájmové chovy a další subjekty zabývající se chovem tohoto rybního druhu. Aby byla zachována stabilní reprodukční schopnost generačních ryb a kvalita produkovaného plůdku i pro další roky, je nutné respektovat základní technologické principy.

- generačním rybám poskytnout před samotným výtěrem optimální podmínky pro vývoj gonád – nejlépe v prostředí s kvalitní přirozenou potravou a při optimální hustotě obsádky
- pro umělou reprodukci selektovat výhradně zdravé ryby v dobré kondici, vhodné velikosti a vhodného stáří (usnadnění manipulace, zvýšení efektivity umělé reprodukce)
- minimalizovat manipulaci s generačními rybami a omezit poškození generačních ryb v průběhu manipulace před umělou reprodukcí, v jejím průběhu i při vysazení k dalšímu chovu, tj. používat vhodné prostředky pro manipulaci s rybami, efektivním způsobem plánovat veškerou manipulaci
- průběžně kontrolovat a udržovat hlavní hydrochemické parametry vody v optimálních hodnotách – důsledně a dostatečně přesně monitorovat obsah rozpuštěného kyslíku při přípravě generačních ryb pro umělou reprodukci, při samotném umělém výtěru ale i dalším držení generačních ryb v rybí líhni a stejně tak kontrolovat parametry vody v rybí líhni
- efektivně zacházet se získanými pohlavními produkty – pro umělé oplození a další inkubaci použít kvalitní a nepřezrálé jikry, odebrané mlíčí skladovat vhodným způsobem po nezbytně dlouhou dobu
- jikry inkubovat v kontrolovaných podmínkách recirkulační líhne – eliminovat vlivy prostředí, počasí a náhlého zhoršení kvality vody pro inkubaci jiker
- v průběhu inkubace jiker zabezpečit jejich čištění a případně vhodný způsob ošetření formou protiplísňových koupelí
- pečlivě dodržovat zoohygienická a veterinární pravidla a omezit veškeré možnosti zavlečení infekčních a parazitárních chorob do prostředí rybí líhne v době inkubace a rozplavání plůdku
- mezi jednotlivými výtěry vhodným způsobem dezinfikovat systém rybí líhne

3. Srovnání novosti postupů

Tato metodika je první publikací v českém jazyce popisující použití taninu nebo acetylcysteinu pro ošetření jiker kaprovitých ryb. Metodika uvádí doposud získané zkušenosti s použitím těchto látek pro odlepkování jiker a kompletně popisuje zkušenosti získané při použití tohoto postupu v rybí líhni Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod s roční produkcí dosahující cca 30-40 milionů kusů váčkového plůdku několika různých linií kapra obecného. Postup popisovaný v této metodice založený na pomalém a postupném bobtnání jiker kapra obecného a následné aplikaci taninu se osvědčil v provozních podmínkách a opakovaně se ukázalo, že jikry ošetřené tímto způsobem v prostředí rybí líhne zásobené vodou z recirkulačního systému nepodléhají infekcím a nevyžadují průběžné ošetřování v průběhu inkubace. Rybí líhne Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod tento postup odlepkování jiker používá k zajištění produkce a experimentálním výtěrům od roku 2021.

Podstata nového postupu spočívá v tom, že se oplozené jikry nechají kontrolovaně bobtnat v aktivační vodě z líhne se zbytkem pohlavních produktů a ovariální plazmy po dobu 5 až 15 min. Na rozdíl od známých způsobů eliminace lepivosti jiker se voda z líhne představující aktivační roztok neodmývá a spolu s ní se tak neodmývají zbytky ovariální plazmy obklopující jikry. Jikry jsou zvolna míchány, dochází k postupnému zvětšování objemu jiker ve vodě z líhne. Jikry jsou tedy jen lehce zalité vodou z líhne a jemně míchány, tím pádem mohou bobtnat, nerozvine se však jejich přirozená lepivost tak, jako v případě, že je odmyta ovariální plazma jiker a jikry jsou vystaveny nadbytku vody nebo emulzi mléka v případě tradičního postupu odlepkování. Tanin je k eliminaci přirozené lepivosti jiker aplikován až po částečném nabobtnání jiker, a to do množství nejvýše v poměru 1:1 vzhledem k roztoku s nabobtnalými jikrami. Následně se odstraní supernatant po době působení 30 s a odstraněné množství se nahradí doplněním vodného roztoku taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹. Odstranění supernatantu a následné doplnění vodného roztoku taninu o koncentraci 2 g.l⁻¹ na dobu působení 20 až 40 s se provede ještě třikrát za sebou. Obdobným způsobem lze použít i roztok acetylcysteinu o koncentraci 0,4 g.l⁻¹.

Výhody způsobu eliminace lepivosti jiker ryb, zejména kapra obecného, při kterém se na oplozené jikry použije roztok taninu podle tohoto postupu, spočívají zejména ve výrazné úspoře času, nikoliv však na úkor efektivity. Sledované parametry úspěšnosti umělé reprodukce kapra, jako je oplozenost jiker a líhňivost nejsou ovlivněny na úkor časové úspory. Jikry odlepkované tímto způsobem nebobtnají tak intenzivně jako jikry odlepkované pomocí Woynarovichovy metody nebo v emulzi mléka, v inkubačních lahvích se tolik nevznáší a inkubační systémy lze naplnit větším množstvím jiker bez rizika jejich ztráty přeplavením díky vznášivosti jiker. Podle pozorování pod stereomikroskopem je povrch jiker výrazně hladší v porovnání s konvenčními metodami odlepkování a lze tedy předpokládat, že inkubované jikry nebudou tolik náchylné k zachycování organických či anorganických nečistot systému či rozvoji patogenů, zejména plísni r. *Saprolegnia*. Jelikož některé metodiky umělé reprodukce ryb využívají krátkou koupel inkubovaných jiker v taninu jako preventivní ošetření jiker proti patogenům, lze také předpokládat podobný efekt této látky zejména pro iniciační fázi inkubace jiker, v recirkulačních i průtočných systémech.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Tato metodika komplexně shrnuje poznatky získané při ověřování nových postupů odlepkování jiker kapra obecného. Metodika poskytuje informace získané při dvou po sobě následujících sezonách optimalizace postupu odlepkování jiker a ověření nových postupů v provozních podmínkách rybí líhne s recirkulací inkubační vody. Metoda odlepkování jiker pomocí taninu byla v těchto podmínkách

optimalizována pro použití v běžném rybářském provozu a je použitelná v rybích líhních produkčních podniků akvakultury, líhních rybářských svazů nebo malých organizací produkujících plůdek pro produkci násadového materiálu do revírů. Vedle samotného postupu odlepkování jiker pomocí alternativních metod založených na taninu nebo acetylcysteinu metodika popisuje kompletně postup umělé reprodukce kapra obecného včetně výběru a přípravy generačních ryb k umělé reprodukci, postupu samotného výtěru, oplození jiker, inkubace a kulení nebo počítání váčkového plůdku pro nasazení.

5. Ekonomické aspekty

Metoda odlepkování jiker pomocí taninu byla optimalizována pro použití v běžném rybářském provozu a je použitelná v rybích líhních produkčních podniků akvakultury. Tato metoda významným způsobem zkracuje proces odlepkování jiker pro inkubaci v podmínkách běžných rybích líhní – průtočných i recirkulačních. Zavedením tohoto postupu odlepkování se na líhni Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod podařilo významně zjednodušit reprodukci kapra a zefektivnit umělou reprodukci kapra. Jikry ošetřené postupem, který je popsán v této metodice, jsou inkubovány v podmínkách recirkulační líhně zpravidla bez významnějšího napadení plísněmi a celková efektivita umělé reprodukce je tak znatelně vyšší. Významným způsobem se také snížila časová a ekonomická náročnost sanitace a dezinfekce recirkulační rybí líhně mezi jednotlivými výtěry.

6. Seznam použité literatury

- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129: 3–48.
- Cejko, D. Žarski, K. Palińska-Žarska, M. Słowińska, R.K. Kowalski. Artificial seminal plasma improves motility and fertilisation capacity of common carp *Cyprinus carpio* L. sperm during one hour of storage. *Aquaculture*, 506 (2019), pp. 224-228, 10.1016/j.aquaculture.2019.03.049
- Das, S.K., 2004. Evaluation of a New Spawning Agent, Ovopel in Induced Breeding of Indian Carps. *Asian Fisheries Science* 17 (2004): 313-322.
- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 91, 35 s.
- Kálal, L., Pružina, I., Tezner, J., 1986. Odběr ovocytů biopsií. Reprodukce a genetika ryb – sborník referátů z vědecké konference, *Vodňany*, s. 188-190.
- Kouřil, J., Podhorec, P., Stejskal, V., Policar, T., Kříšťan, J., Drozd, B., 2011. Optimalizace metod hormonálně indukované ovulace při řízené reprodukci vybraných hospodářsky významných teplomilných druhů ryb. *Edice Metodik (Certifikovaná metodika), FROV JU Vodňany* 120: 34 s.
- Kouřil, J., Policar, T., Podhorec, P., Stejskal, V., 2020. Hormonální stimulace vybraných druhů ryb k umělému a poloumělému výtěru. *Edice metodik (Ověřená technologie), FROV JU Vodňany*, 176: 105 s.
- Krupauer, V., Kubů, F., 1985. *Kapr obecný. ČRS, Praha*. 201 s.
- Linhart, O., 2004. *Učební text, řízená reprodukce ryb, ZF/VÚRH JU*.
- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina, I., 1995: *Atlas kaprů chovaných v České republice*. Victoria Publishing, Praha, 69 s.

- Rodina, M., Flajšhans, M., 2008. Využití RFID technologie ke značení ryb v ČR. Bulletin VÚRH Vodňany, 44 (4): 100-108.
- Soin, S.G., 1976. Two new methods for elimination of egg stickiness. Rybnoe Chozjajstvo 10, 18–21.
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A. and Sauerborn Klobucar, R., 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. Journal of Applied Ichthyology, 28: 553-564. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x>
- Woynarovich, E. 1964. Hatching of Carp Eggs in Zuger-Glasses and Breeding of Carp Larva until an Age of 10 Days Baruidgeh, (Israel), 4(2) :38-46.
- Woynarovich, E. 1964. Uber die Kunstfische Vermehrung des Karpfen und Erbrüitung des Laiches in Zuger-Glasern, Wasserund Abwasser, Beitr'age zur Gewasser Forschung (Vienna) IV. 210-217.
- Zibiene, G., Sviriniene, Z., Zibas, A., 2018. The effects of tannic acid on the effectiveness of egg fertilization and removing carp egg adhesiveness. <http://doi.org/10.15544/RD.2017.016>

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). The artificial reproduction of common carp (*Cyprinus carpio* L.) Edice Metodik (technologická řada), FROV JU Vodňany, č. 99, 43 s.
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 133, 38 s.
- 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, Vodňany, 77, 3-19.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Rodriguez, M., 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. Aquatic Living Resources, 16 (5): 450–456.

Dedikace

Výsledky byly získány za podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum NAZV QK1910428 Uchování genetických zdrojů kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk – 100 %.

Externí odborný oponent

Prof. Ing. Radovan Kopp, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně, Oddělení rybnářství a hydrobiologie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, www.mendelu.cz

Interní odborný oponent

Ing. Marek Rodina, Ph.D.

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

Oponent za státní správu

Ing. Štěpánka Scháňková, Ph.D.

Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybnářství, Oddělení rybnářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. /2023 ze dne xx. xx. 2023

vydalo Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybnářství, Oddělení rybnářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Adresa autorského kolektivu

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

Ing. Martin Hubálek, Ph.D.

Ing. Roman Franěk, Ph.D.

Vladimír Novotný

Ing. David Gela, Ph.D.

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

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz; přidělený editor: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.; redakce: Zuzana Dvořáková; náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2023; vtištěna v roce 2023; grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.