



Umělý výtěr ryb, krátkodobé uchování gamet ryb



Co je to umělý výtěr?

- Člověkem řízený proces (uměle vyvolaný a časově naplánovaný) vedoucí k získání gamet ryb

Proč umělý výtěr provádíme?

- Výzkumné účely
- Chovatelské a ochranářské důvody:
 - ✓ Získání dostatečného množství životaschopného potomstva pro užitkové chovy
 - ✓ Obnova stavů plemenných ryb pro další chov, udržování genetických zdrojů, produkci násad určených k vysazování do volných vod
 - ✓ Produkce násad určených k vysazování do volných vod (reintrodukce, podpora přirozených populací, vysazování nepůvodních druhů)
 - ✓ Kryokonzervace gamet

Fáze umělého výtěru (UV)



- 1) Evidence stavu generačních ryb, výběr ryb k výtěru
- 2) Předvýtěrová příprava
- 3) Hormonální stimulace ryb k výtěru
- 4) Vlastní výtěr samců a samic
- 5) Krátkodobé uchování spermií a jiker před osemeněním
- 6) Osemenění jiker a Aktivace gamet
- 7) Eliminace lepivosti jiker
- 8) Inkubace jiker a jejich ošetřování
- 9) Odchov váčkového plůdku do přechodu na vnější výživu

1. UV – evidence a výběr ryb



- Zjištění stavů generačních ryb, zařazení remontních ryb do stavů generačních, zhodnocení kondice ryb (připravenosti k výtěru)
- Výběr ryb musí odpovídat potřebě váčkového plůdku a/nebo účelu provádění umělého výtěru. Chceme-li:
 - Získat dostatečného množství životaschopného potomstva pro užitkové chovy – počet ryb odpovídá potřebě váčkového plůdku, jejich plodnosti, průměrné oplozenosti a ztrátám v průběhu inkubace
 - Obnova stavů plemenných ryb – počet ryb nejméně 15 samic a 25 samců od plemene/populace/druhu, dle možností a potřeby zvyšujeme nejlépe až do dosažení $N_e = 100$.
 - Produkce násad určených k vysazování do volných vod (reintrodukce, podpora přirozených populací, vysazování nepůvodních druhů) – stejně jako při obnově stavů plemenných ryb
 - Kryokonzervace gamet – dle potřeby a účelu
- Výběr dle charakteru – pouze negativní nebo pozitivní

2. UV - Předvýtěrová příprava

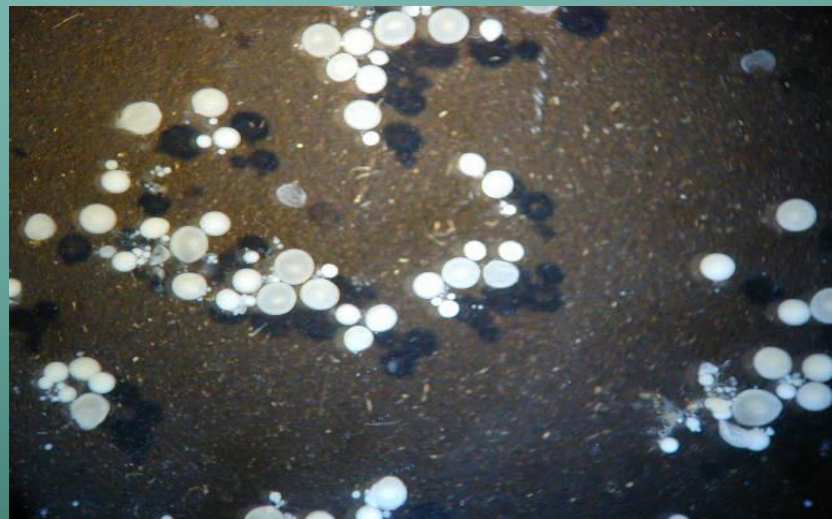
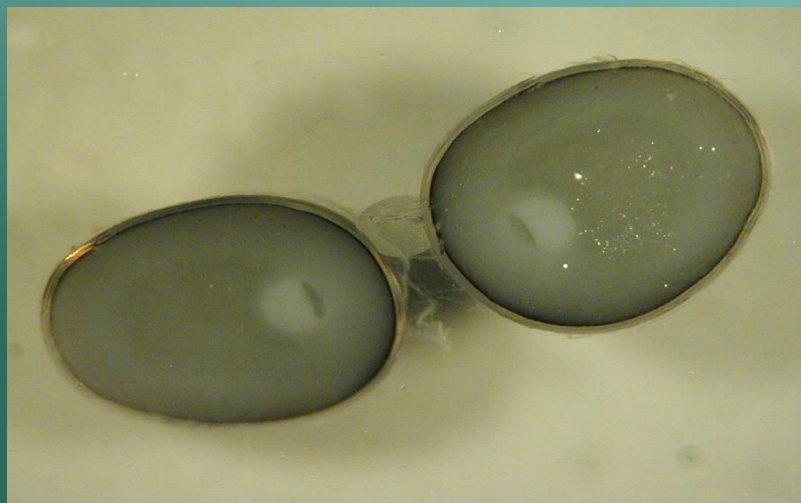


- Pro kvalitní dozrání pohlavních produktů generačních ryb a jejich přípravě k výtěru je nutné dodržovat základní zootechnická opatření dle druhu ryb
- Je nezbytné zajistit generačním rybám:
 - ✓ adekvátní potravní nabídku (přirozená potrava, příkrmování, kompletní krmné směsi) s požadovaným zastoupením jednotlivých živin
 - ✓ vhodné životní podmínky (prostor, kvalita vody, minimalizace stresových faktorů apod.)
- V předvýtěrovém období je již vhodné držet pohlaví odděleně – nebezpečí spontánního výtěru při chovu samic a samců ve společné obsádce
- Pravidelná kontrola teploty vody
- Je-li nezbytné možnost kontroly fáze zralosti ovocytů

2. UV - Předvýtěrrová příprava



- Odběr ovocytů biopsií nebo přes pohlavní vývod



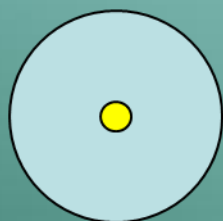
2. UV - Předvýtěrová příprava



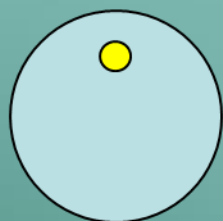
- Použití tzv. prosvětlovacího roztoku
- Stanovení pozice jádra

Předčasné k
stimulaci k výtěru

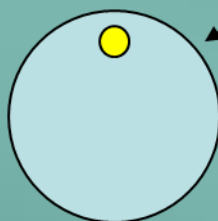
Vhodné k stimulaci k výtěru



I.



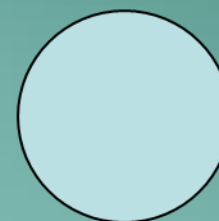
II.



III.



IV.



V.

I. – jádro v centální pozici, II. – jádro s velmi významnou migrací k animálnímu pólu, III. – jádro na periferii, IV. – zrající ovocyt s „rozpadajícím se jádrem“ tzn. v období I meiozy, V. – ovulovaný ovocyt – neznatelné jádro

3. Hormonální stimulace



- Dle druhu ryby, podmínek a zvyklostí převezeme ryby (1-3 dny před výtěrem) na líheň a umístíme je do manipulačních nádrží – důležité zajistit adekvátní teplotu a obsah kyslíku ve vodě !!!
- U některých druhů ryb postačí vhodná fotoperioda, teplota, výtěrový substrát a přítomnost druhého pohlaví k výtěru (příklad štika, lososovité ryb, candát, okoun). U těchto druhů stačí pravidelnou kontrolou ověřovat stav jikernaček k výtěru.
- U jiných druhů ryb (kapr, lín, sumec atd.) je nezbytné pro docílení výtěru jikernaček použít hormonální stimulaci v určitých definovaných podmínkách prostředí s přesnou dávkou stimulující látky na kg hmotnosti jikernačky. Obecně u hypofýzy postačí k stimulaci 2-5 mg kapří hypofýzy u GnRHa/LHRHa to jsou mikrogramy na kg hmotnosti jikernačky. U mlíčáků se většinou používá k stimulaci pouze kapří hypofýza.
- Je-li vhodné použijeme anestézi před hormonální stimulací

3. Hormonální stimulace



- Po hormonální stimulaci probíhá „latentní“ období pro dozrání ovocytů a je nezbytné odhadnou období výtěru. Latentní období se počítá v tzv. hodinových stupních tzn. (teplota v daném období x čas v hodinách od injikace do výtěru). Příklad sumec velký, nezbytné latentní období je v průměru 500 hodinových stupňů (tzn. $22^{\circ}\text{C} \times 23 \text{ h} = 506 \text{ Oh}$).
- Po hormonálních stimulacích je nutné udržovat stejnoměrnou výtěrovou teplotu, případně ji nepatrně zvyšovat; jikernačky a mlíčáci jsou připravováni vždy odděleně, ale pokud možno na společném okruhu vody z důvodu stimulace feromony; u sumce je připravováno každé zvíře v separátním oddělení s dostatkem kyslíku (alespoň 5-6 mg $\text{O}_2/\text{xml}-1$).
- V době kdy se předpokládá výtěr je nutné jikernačky kontrolovat a vytříit.

4. Vlastní umělý výtěr samců



- Sperma nekontaminované močí vytíráme odděleně do suchých zkumavek, stříkaček, kádinek, odběrných kontejnerů nebo přímo na jikry
- U spermatu kontaminovaného močí vytíráme sperma do tzv. imobilizačního roztoku; nutné dodržovat určitý podíl roztoku a spermatu (např. sumec maximálně 1:1 u roztoku 200 mmol NaCl, 30 mmol trisu, pH 7, tzn. 11,8 g NaCl, 3,6 g trisu; lín 3:2 apod.)
- Po výtěru zaznamenáme do výtěrového listu objem spermatu a další údaje



4. Vlastní umělý výtěr samic



- Nekontaminovat jikry vodou, výkaly, krví, močí
- V případě kontaminace provést ihned osemenění a aktivaci vodou nebo oddělit moč od jiker, či část gamet kontaminovaných močí vyhodit
- U lososovitých ryb se někde praktikuje výtěr jiker do sítěk (cedníků)
- Jikry se znaky přezrání (rozpad jiker, bílé jikry, velké množství ovariální plazmy) se nepoužívají k osemenění
- Jikry se vytírají do dostatečně velkých nádob se známou hmotností, po výtěru se zaznamenává do výtěrového listu hmotnost vytřených jiker, z hmotnosti vytřených jiker odvozujeme celkové množství jiker



5. Krátkodobé uchování gamet



Důvody krátkodobého uchování

- Transport gamet
- Křížení mezidruhové, meziliniové
- Technologické aspekty, možnost výtěru mlíčáků v předchozím dnu a následující den pouze jikernaček
- Dokonalé využití ryb v selekčních programech
- Využití spermatu při několika výtěrech jikernaček
- Dokonalé využití testikulárního spermatu
- Havarijní stavy na líhních
- Předčasné úhyny jikernaček

5. Krátkodobé uchování gamet



Uchování spermatu

- Sperma kontaminované výkaly a s nízkou pohyblivostí spermií pod 90 % neuchováváme
- Sperma uchováváme tak aby vrstva spermatu nebyla vyšší než 3-4 mm s deseti až 20 násobkem objemu vzduchu. Uchování vždy v aerobním prostředí. V anaerobním prostředí – rychlá spotřeba ATP, rozvoj glykolýzy, změna pH spermatu do kyselé oblasti, postupná destrukce bičíku spermií
- Uchováváme na ledu nebo v chladničce v teplotním rozmezí mezi 0 až + 2°C.
- Sperma neošetřené antibiotiky možné uchovávat podle druhů 12-72 h, většinou po 72 h rozvoj bakterií
- Sperma je možné ošetřit širokospektrálními antibiotiky v řádu 1000 mezinárodních jednotek, nebo stovek µg/ml spermatu



5. Krátkodobé uchování gamet



Uchování jiker

- V těle jikernačky ovulované ovocyty (in vivo)
 - ✓ U studenomilných druhů po ovulaci nebo úmrtí možnost uchování oplozovací schopnosti 24-48 h (lososovité ryby, štika)
 - ✓ U teplomilných druhů jako je kapr nutnost okamžitého výtěru jiker, u sumce velkého s opožděným výtěrem jiker roste množství deformit vykuleného plůdku se snižováním jejich líhnivost
- Jako vytřené jikry neoplozené v ovariální plazmě (in vitro) - nejvhodnější
 - ✓ Jikry nesmí být kontaminované močí, výkaly a vodou
 - ✓ V aerobním prostředí v nádobách přikrytých vlhkou utěrkou
 - ✓ U teplomilných druhů uchování při konstantní teplotě nižší o 2-4°C než je výtěrová teplota, dostatečná vlhkost (u kapra obecného uchování až 6 h s oplozovací schopností 80 %)
 - ✓ U studenomilných druhů – lososovité uchování 24-48 h při 4°C
- Jako vytřené jikry neoplozené v ředidle (v praxi se nepoužívá)
- Jako vytřené jikry osemeněné (nedoporučuji, je vhodnější uchovávat gamety odděleně)

6. Osemenění a aktivace



- Znalost minimálního množství spermatu k osemenění, pokud je dostatečné množství spermatu používáme větší množství než menší
- Každé sperma by se mělo naředit vodou nebo aktivačním roztokem alespoň v poměru 1:10, tzn. nedáváme větší objem spermatu než je desetina objemu aktivačního média, tzn. (10 ml spermatu + 90 ml vody)
- Obecně u kaprovitých a lososovitých ryb se používá minimálně 10-30 tisíc spermií/jikru, u sumce a jeseterovitých ryb 1000-10000 spermií na jikru
- Osemenění rozdělujeme na:
 - ✓ Klasické suché, kdy po dobrém smísení jiker a spermatu provádíme aktivaci aktivačním roztokem či vodou (lososovité ryby, štika, kapr)
 - ✓ Osemenění „mokrý“ sperma se aktivuje ve vodě a do 10 s se přidávají jikry (jeseterovité ryby)
 - ✓ Osemenění a aktivace současná tzn. současně po přidání vody či aktivačního roztoku se přidává sperma (sumec, lína) - praktikuje se u těch druhů, kde se sperma odebírá do imobilizačního roztoku

7. Eliminace lepivosti jiker



- Provádí se ručně ve větší misce nebo přímo v inkubačních aparátech s probublávajícím vzduchem
- K odlepkování se používají:
 - ✓ suspenze jílu či talku (20-50 g/l), mléko – dlouhodobé odlepkování (40-70 minut)
 - ✓ Proteolytický enzym (alkaláza), tanin - krátkodobě odlepk. 2 minuty
- Při použití enzymu:
 - ✓ Nutno ověřit účinnost enzymu na vzorku, především při přechodu na enzym s jinou aktivitou
 - ✓ Dodržovat přesný čas na sekundy, koncentraci a teplotu



8. Inkubace jiker



- Inkubace prováděna v tzv. **inkubačních aparátech**, které se liší dle druhu ryby
- Doba inkubace se druhově specifická a je uváděna v tzv. denních stupních ($^{\circ}\text{D}$) = Denní průměrná teplota * počet dní inkubace (např. štika má inkubační dobu 120°D , při teplotě 10°C bude inkubace probíhat 12 dní, při teplotě 17°C to bude 17 dní) – korelace mezi teplotou vody a sumou $^{\circ}\text{D}$!!!
- Doba inkubace je 1-2 dny u teplomilných ryb a až 4 měsíce u chladnomilných ryb
- Je vhodné odhadnout procento oplozenosti jiker – do 24 hod. po oplození u teplomilných a do 72 hod. u studenomilných
- V průběhu inkubace je potřeba odstraňovat neoplozené jikry a hygienizovat vodu (UV záření, ozonizace, koupele jiker)

9. Počáteční odchov plůdku



- Vykulený váčkový plůdek je až do období do rozplavání (nasazení nebo přechodu na vnější výživu) chován v inkubátorech pro jikry (lososovité ryby) nebo přenášen (přeplavován) do speciálních inkubátorů či žlabů s různým typem přítoku (dle druhu ryby)
- Pokud to vyžaduje daný druh, přidává se přírodní (větvíčky, tvrdé travní porosty) nebo umělý materiál k zavěšení plůdku do rozplavání)

