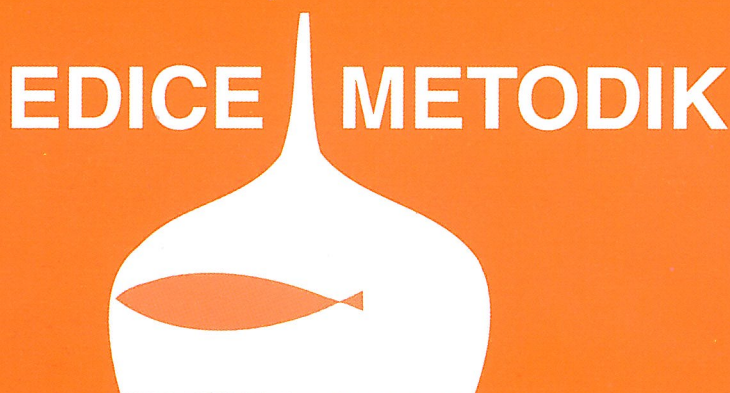


JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VE VODŇANECH

ŘÍZENÁ REPRODUKCE JESETERŮ (Acipenser)



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ VE VODŇANECH

ŘÍZENÁ REPRODUKCE JESETERŮ (*Acipenser*)

D. GELA, M. RODINA, O. LINHART

č. 78

Vodňany

2008

ISBN 978-80-85887-62-4

Obsah

Úvod	3
Chrupavčití a akvakultura	6
Generační ryby, určení jejich pohlaví a předvýtěrová příprava	6
Určení zralosti ovocytů	8
Řízená reprodukce ryb	9
Teplotní stimulace ryb	9
Výtěr mlíčáků	10
Výtěr jikernaček	10
Oplození, aktivace a odlepkování jiker	11
Inkubace jiker	11
Záchranný chov jesetera čínského	12
Použitá literatura	13
Fotopříloha	15

Úvod

Auři této práce si dali za cíl formou technologické metodiky pro odbornou veřejnost zpracovat základy problematiky řízené reprodukce generačních ryb jeseterů v podmínkách středoevropské akvakultury.

Jeseteri patří do nadřádu chrupavčitých ryb (*Chondrostei*), který se dělí na dvě čeledi (veslonosovití – *Polyontidae* a jeseterovití – *Acipenseridae*) a od nadřádu kostnatých ryb liší v několika základních bodech:

1. z nalezených fosilií se odhaduje, že chrupavčití se na Zemi vyskytují více než 250 miliónů let (kostnaté ryby asi 60 miliónů let)
2. přirozeně se vyskytují pouze na severní polokouli
3. mají heterocerní ocasní ploutev
4. ústa na spodině hlavy a hlava vybíhající v různě dlouhé rostrum
5. tělo je pokryto 5 podélnými řadami velkých kostěných štítků (ganoidními šupinami) (jeseterovití) nebo je lysé (veslonosovití)
6. jeseterovití zahrnují druhy dosahující v dospělosti hmotnosti od několika stovek gramů do několika tun. Např. vyza velká je největší sladkovodní rybou na světě (největší vyza, o které existují záznamy, vážila 2075 kg a měřila 8,5 metru. Byla ulovena bez jiker roku 1736, pravděpodobně se jednalo o mlíčáka. Zhruba o třicet let později zaznamenali kozáci na Uralu odchyt jikernačky vyzy, která vážila více než 1144 kg. Její jikry vážily 410 kg (Saffronová, 2004)
7. většinou se jedná o dlouhověké ryby, některé druhy se dožívají více než 100 let a s tím souvisí relativně pozdní pohlavní dospělost (6 – 25 let).

Systematicky chrupavčité řadíme (Rochard, E., et al., 1991, Hochleithner M., 2004, www.wscs.info):

Třída: Ryby – *Osteichthyes*

Podtřída: Paprskoploutví - *Actinopterygii*

Nadřád: Chrupavčití – *Chondrostei*

Čeleď: Veslonosovití – *Polyontidae*

Polyodon spathula veslonos americký

Psephurus gladius veslonos čínský

Čeleď: Jeseterovití – *Acipenseridae*

Rod: *Pseudoscaphirhynchus*

Pseudoscaphirhynchus kaufmanni

Pseudoscaphirhynchus hermannii

Pseudoscaphirhynchus fedtschenko

Rod: *Scaphirhynchus* lopatonos

Scaphirhynchus albus

Scaphirhynchus mexicanus

Scaphirhynchus platorhynchus

Scaphirhynchus suttkusi

Rod: vyza *Huso*

Huso dauricus kaluga

Huso huso vyza velká

Rod: Jeseter – *Acipenser*

autochtonní v Severní Americe:

Acipenser brevirostrum jeseter krátkonosý

Acipenser fulvescens jeseter jezerní

Acipenser medirostris jeseter zelený

*Acipenser oxyrinchus** jeseter atlantský (ostronosý)

Acipenser transmontanus jeseter bílý

autochtonní v Evropě:

Acipenser gueldenstaedti jeseter ruský

Acipenser naccarii jeseter jadranský

Acipenser nudiiventris jeseter hladký

Acipenser ruthenus jeseter malý

Acipenser stellatus jeseter hvězdnatý

*Acipenser sturio** jeseter velký

autochtonní v Asii:

Acipenser baeri jeseter sibiřský

Acipenser dabryanus

Acipenser kikuchii

Acipenser mikadoi

Acipenser multiscutatus

Acipenser persicus

Acipenser schrencki

Acipenser sinensis jeseter čínský

* V současné době panuje ve vědeckých kruzích částečná nejednotnost na systematické řazení druhů *A. sturio* a *A. oxyrinchus*. Výsledky provedených analýz tkáňových vzorků DNA u těchto dvou druhů poskytují dvě hypotézy. Že *A. sturio* a *A. oxyrinchus* jsou samostatnou z vývojových větví rodu *Acipenser*. První hypotéza předpokládá, že před 90 mil. let byla na Zemi pivoňní forma jesetera atlantského, která dala základ pro vznik dvou blízkých druhů - *A. sturio* a *A. oxyrinchus*. Druhá hypotéza zastává názor, že druhová podobnost je dána pomalou evolucí

genomu jeseterovitých ryb a jedná se stále o jeden druh. Genetická podobnost některých populací byla v minulosti ještě upevněna vědecky potvrzenými sekundárními kontakty jedinců. Molekulární analýzy muzeálních vzorků prokázaly přirozený výskyt hybridní populace *A. oxyrinchus* - *A. sturio* v Baltském moři a jeho přítocích. Tato hybridní populace pravděpodobně vznikla rozšířením americké populace ze Severovýchodního pobřeží Ameriky k Evropě v období poslední malé doby ledové (Fontana, F. et al., 2008). Tiedemann et al. (2007) vychází z toho, že k této hybridizaci mohlo dojít ve středověku (v tzv. malé době ledové, která trvala od roku 1350 do roku 1880 n. l.), což uvádí před ním Ludwig et al., 2002. Ludwig předpokládal, že *oxyrinchus* nahradil *sturia*. Tiedemann potvrdil přítomnost alel obou druhů a předpokládal migraci *A. oxyrinchus*, adaptovaného na chlad, a křížení hlavně samic *A. oxyrinchus* se samci baltické populace *A. sturio*. Na základě těchto výsledků od roku 2004 probíhají aktivity na obnovu baltské populace jesetera *A. oxyrinchus* vysazováním ryb odchovaných z importovaných jiker z Kanady do polských řek Drawy a Drweczy (Kolman, R., 2008).

V současné době se činností člověka u všech druhů chrupavčitých ryb rapidně snižuje jejich přirozený výskyt ve volné přírodě (Tab. 1, 2). Příčiny snižování diverzity a početnosti jeseterů lze shrnout do šesti základních bodů:

- 1) Nadměrný legální a ilegální odlov ryb z volných vod za účelem získání luxusního zboží, tzn. kaviáru a masa a nelegální obchod s tímto zbožím. V souladu s výsledky 10. konference členských zemí CITES jsou od 1.4.1998 všechny druhy jeseterovitých ryb (*Acipenseriformes spp.*) zařazeny v příloze II k CITES, s výjimkou druhů *Acipenser brevirostrum* a *Acipenser sturio* (jeseter velký), které jsou v příloze I. Pro mezinárodní obchod s kaviárem jsou tedy nutné doklady CITES. Zároveň bylo členským zemím doporučeno, aby zrušily kontroly a vyžadování dokladů CITES pro dovoz nebo vývoz kaviáru pro osobní potřebu fyzických osob v množství do 250 g/osobu. (www.env.cz)
- 2) Pozdní pohlavní dospívání ryb násobené tím, že jikernačky jsou schopny opětovné reprodukce po třech až čtyřech letech.
- 3) Výrazná migrace největších jeseterovitých a veslonosovitých druhů. Jsou to silně migrující ryby, některé druhy sice žijí ve sladkých vodách celý život, ale většina z nich část života tráví v mořích a pouze za účelem reprodukce se vydávají do horních toků řek. Při této cestě proplouvají i přes politicky a ekonomicky nestabilní státy, které se nedostatečně věnují jejich ochraně.
- 4) Stavby a umělé překážky na řekách, které nejsou migrující ryby schopny překonat a dostat se na místa přirozeného výtěru. Řeky jsou dále devastovány změnou jejich přirozených koryt zanášením naplaveninami.
- 5) Znečištění řek a moří, které zhoršuje reprodukční schopnosti ryb, kvalitu pohlavních produktů, zapříčiňuje zvýšený výskyt abnormalit a vnímavost ryb vůči nemocem a parazitům a současně snižuje dostupnost přirozené potravy pro všechny věkové kategorie ryb (Altu'ev, Y., 1997, Debus, L, 1997).
- 6) Malé finanční subvence do výzkumu zaměřeného na zvládnutí managementu chovu a řízení reprodukce u většiny chrupavčitých ryb.

Tab.1: Dramatické snižování počtu generačních ryb ulovených ve Volze v jednotlivých obdobích (v tisících kusů) (Speer L. et al., 2000).

Rok	Vyza velká	Jeseter ruský	Jeseter hvězdnatý
1961-1965	26,0	860,3	535,4
1966-1970	26,0	1569,9	538,7
1971-1975	20,7	1983,3	490,0
1976-1980	16,6	2743,0	572,2
1981-1985	14,6	1072,0	626,3
1986-1990	12,7	717,7	683,1
1991-1995	7,0	354,8	289,2
1996-1997	1,8	102,0	132,0

Tab. 2: Roční výlovky (v tunách) z volných vod (Údaje ze statistiky FAO (www.fao.org)).

Kontinent	Voda	Rod	2000	2001	2002	2003	2004
Severní Amerika	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	281	173	172	172	172
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	245	199	207	166	170
Severní Amerika celkem			526	372	379	338	342
Asie	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	1 288	1 231	961	831	836
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	4	3	7	5	4
Asie celkem			1 292	1 234	968	836	840
Evropa	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	704	677	526	600	286
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	81	30	35	14	11
Evropa celkem			785	707	561	614	297
Suma celkem			2 603	2 313	1 908	1 788	1 479

Chrupavčití a akvakultura

Počátek chovu jeseterů v řízených podmínkách je datován více než před sto lety, kdy chovaní jedinci byli odlovováni z volně žijících populací. První pokusy o akvakulturní reprodukci a odchovy v Evropě a Severní Americe jsou zaznamenány z let 1880 až 1920, ale neměly valného úspěchu. Za první zemi s úspěšnou reprodukcí jeseterů se považuje Sovětský svaz a léta okolo roku 1930 (Doroshov, 1985). Mimo území bývalého SSSR byl první úspěšný umělý výtěr uskutečněn v roce 1979 na Kalifornské univerzitě v USA u jesetera bílého (*A. transmontanus*) (Hung, 1991). Výtěr ryb spočíval v odchytu generačních jedinců při migraci na trdliště nebo přímo na místech přirozeného výtěru. Po usmrcení ryb se odebraly z břišní dutiny ovulované ovocyty s následným umělým osemeněním, aktivací a inkubací jiker.

Klasická metoda umělého výtěru jikernaček masáží břišní dutiny je komplikována anatomií gonád a vejcovodů: jikry jsou ovulovány do tělní dutiny, přičemž nálevka vejcovodu se nachází v dorzální části tělní dutiny přibližně v polovině délky těla. Při tlaku na břišní partie během umělého výtěru „klasickou metodou“ dojde k vytření pouze části ovulovaných jiker v malých porcích, protože tlakem na břišní partie nastane přímáčknutí gonád na klenbu tělní dutiny a uzavření vejcovodů. Proto je tato procedura velmi zdlouhavá a náročná pro rybu i personál, kdy výtěr trvá s přestávkami až 8 hodin (Linhart et al., 2000).

Urychlení procesu přinesla metoda tzv. „císařského řezu“, která splňovala podmínku přežití a možnosti další reprodukce ryby. Je známo až pět úspěšných operací u jedné ryby (Conte F. S., et al., 1988, Speer L. et al., 2000). Operace se prováděla otevřením břišní dutiny ventrálním řezem v délce 100 – 200 mm (podle velikosti jikernačky), odběrem ovulovaných jiker lžící, dezinfekcí řezu a následným zašitím řezu břišní dutiny. V současné době se tato invazivní a rovněž náročná metoda využívá okrajově (celá operace trvá zhruba 30 minut). Nejlepší výsledky s přežitím a rekonvalescencí ryb po operaci dává miniinvazivní chirurgické proříznutí vejcovodu a výtěr ovulovaných jiker – viz. kapitola Výtěr jikernaček (Štěch L. et al., 1999).

Díky zvýšenému zájmu o chrupavčité ryby jako ohrožených druhů s možností reintrodukce zpět do volné přírody, ale také díky neustálému rozšiřování znalostí a propracovanosti metod chovu (speciální krmné směsi, zvládání problematického rozkrmu) a

řízené reprodukce v intenzivních podmínkách (hormonální analogy, kryoprezervace spermií, aktivační roztoky,...) se pro stále více chovatelů po celém světě jeví zvláště některé druhy chrupavčitých jako perspektivní i pro akvakulturní chov (Tab. 3). Některé rybí farmy chovem chrupavčitých ryb rozšiřují svou nabídku komerčních produktů v živém i zpracovaném stavu, některé farmy se na tyto ryby úzce specializují.

Generační ryby, určení jejich pohlaví a předvýtěrová příprava

Původní způsob získávání generačních ryb odlovem z přirozeného prostředí se v současnosti využívá spíše pro zachování druhu, než pro reprodukci ke komerčnímu využití (odlovy jesetera velkého ve Francii na řece Gironde, v Číně jesetera čínského na Yangtze River apod. - Williot P. et al., 2001, Wei Q. W. et al., 2006). V současnosti je proto nejobvyklejší získat chovné hejno výběrem pohlavně dospělých ryb z obsádky chované v intenzivních, polointenzivních či nejlépe extenzivních podmínkách rybích farem. Jak již bylo uvedeno výše, pohlavní dospělost u jeseterů nastává podle druhu a vnějších faktorů po minimálně pěti letech (Hochleithner M., 2004). Jelikož se v Čechách setkáváme hlavně s třemi druhy jeseterů (jeseter malý, jeseter sibiřský a jeseter ruský), budou hodnoty dále uvedené zaměřeny převážně na ně, i když metodický postup je platný a podobný pro celý rod jeseterů.

Tab. 3: Roční produkce (v tunách) z akvakulturních chovů (jeseteři, veslonosi). Údaje ze statistiky FAO (www.fao.org).

Kontinent	Voda	Rod	2000	2001	2002	2003	2004
Severní Amerika	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	281	173	172	172	172
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	245	199	207	166	170
Severní Amerika celkem			526	372	379	338	342
Asie	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	1 288	1 231	961	11 702	12 105
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	4	3	7	5	4
Asie celkem			1 292	1 234	968	11 707	12 109
Evropa	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	3 787	3 764	4 336	4 464	4 556
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	81	30	35	14	11
Evropa celkem			3 868	3 794	4 371	4 478	4 567
Suma celkem			5 686	5 400	5 718	16 523	17 018

Máme-li v chovu ryby ve věku a velikosti (Tab. 4), kdy by již mohly mít vyvinuté pohlavní orgány v detekovatelném stádiu zralosti, je prvním krokem určení pohlaví ryb a jejich individuální označení. Pro dlouhodobý a úspěšný chov je z genetického hlediska vhodné udržovat alespoň tři původem odlišné populace od každého chovaného druhu s doporučeným odstupem stárí ryb nejméně dvou let a postupným označením po 300 kusech remontních ryb z každé populace. V průběhu budoucí reprodukce je nezbytné mezi sebou vzájemně rotovat jednotlivé rodiče z jednotlivých populací. Jen tento po všech stránkách velmi náročný způsob chovu snižuje nebezpečí příbuzenské plemenitby a případného genetického driftu, který je nebezpečný právě pro populace s malým počtem

reprodukováných jedinců. Cílem z genetického hlediska vyváženého chovu je minimální držení alespoň 900 kusů juvenilních ryb a s finálním hejnem 300 kusů dospělých ryb.

Pro individuální značení ryb se nejlépe osvědčila kombinace implantovatelných mikročipových značek – PIT-tagů a barevné ploutevní značky s číslem pro vizuální odlišení pohlaví (dodržujeme zavedený zootechnický systém: jikernačky - samice mají značku žlutou, mlíčáci - samci červenou). Nezbytnou samozřejmostí je zavedení všech dat individuálně značených ryb do databáze (nejlépe počítačové např. „Evidence 2003“, Gela D. et al., 2006), kde mohou být data tříděna dle druhu, původu populace, pohlaví, individuálních hodnot, atd.).

Individuální značení dále umožňuje:

- vytvořit plán obratu chovného hejna
- zaevidovat určené pohlaví,
- určit a evidovat stádia zralosti ovocytů u jikernaček a jejich stádium vývoje; managementem teploty vody jsme si schopni připravit příslušný počet ryb k výtěrům podle požadavků trhu nebo ke kapacitním možnostem rybí farmy,
- cíleně vyřazovat nevhodné a neperspektivní jedince, jedince neschopné výtěru (především u mlíčáků) nebo jedince s nízkými reprodukčními vlastnostmi.

Určení pohlaví je v principu možné více způsoby: biopsií tkáně gonád, sonograficky nebo podle hormonálního profilu krve. Určení pohlaví a zároveň odběr ovocytů ke stanovení stádia zralosti se na většině farem provádí biopsií tkáně (Obr. 1) v období předpokládaného dosažení pohlavní dospělosti ryb (Tab. 4). K biopsii se využívá speciální trokar (sonda) (Kazanski et al., 1978), který musí být přizpůsoben velikosti očekávaných ovocytů podle druhu ryby tak, aby nedošlo k jejímu poškození. Dezinfikovaným (např. roztok hypermanganu 1 g . l⁻¹ teplé pitné vody) trokarem penetrujeme břišní stěnu. Trokar zasuneme dostatečně hluboko, ale pokud možno šetrně, abychom nepoškodili ostatní vnitřní orgány (především střevo). Následně šroubovitým otočením trokaru odebereme vzorek tkáně.

Tab. 4: Věk při dosažení pohlavní dospělosti, průměrná velikost jiker a počet zralých vytřených jiker v 1 g (Hochleithner M., 2004).

Druh	pohlavní dospělost (roky)		velikost jiker (mm)	počet jiker v 1 g
	mlíčáků	jikernaček		
jeseter malý	3 – 7	5 - 9	1,9 – 2,5	110 -120
jeseter sibiřský	9 – 15	10	2,4 – 2,9	50 - 55
jeseter ruský	8 – 14	10 – 20	2,8 – 3,8	45 – 70
jeseter hvězdnatý	9-14	11-15	2,7-3,2	70-100
vyza velká*	10-16	14-20	3,3-4,5	27-45

**Pohlavní dospělost vyzy velké podle zkušeností firmy Gross (Fischzucht Peter und Udo Groß GmbH & Co. KG, Německo) nastává v západoevropských podmínkách v chovu na oteplené vodě u mlíčáků v 7-9 letech a u jikernaček v 11-13 letech.*

Vzorek tkáně posuzujeme bezprostředně makroskopicky (přítomnost jiker nebo tkáně testes či tukové tkáně), popřípadě mikroskopicky v nativním stavu (komprimační preparát při zvětšení 50-100x). V případě detekce jiker ve 3. - 4. vývojovém stádiu (ovocyty šedé až černé barvy) fixujeme odebraný vzorek (alespoň 10 ks) v Sérově roztoku (složení na 100 ml: 60 ml ethanolu 96 %, 30 ml formaldehydu 38 %, 10 ml ledové kyseliny octové 99%; Rodina, 2006)

pro následnou analýzu zralosti ovocytů. Místo vpichu důkladně ošetříme dezinfekčním roztokem (např. hypermanganu $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo jiného vhodného dezinfekčního prostředku). Ačkoliv se tato invazivní metoda jeví velmi drasticky, je pro rybu poměrně bezpečná, pokud dodržíme hloubku a směr vpichu. Rána se zahojí během několika týdnů.

Určení zralosti ovocytů

Vzorky ovocytů v Sérově roztoku jsou konzervovány a určování jejich zralosti může být provedeno nejdříve po 24 hodinách od odběru. Ovocyt se opláchne pitnou vodou a rozřízne (nejlépe žiletkou) na poloviny v podélné rovině (Obr. 3) a pod stereomikroskopem se při zvětšení (cca 30-ti násobném) určí poloha jádra (Kazanski et al., 1978, Rodina, 2006). Optimální poloha je dána klasifikačním indexem (ℓ) na úrovni 0,06. (Kazanski et al., 1978 uvádí $\leq 0,07$)

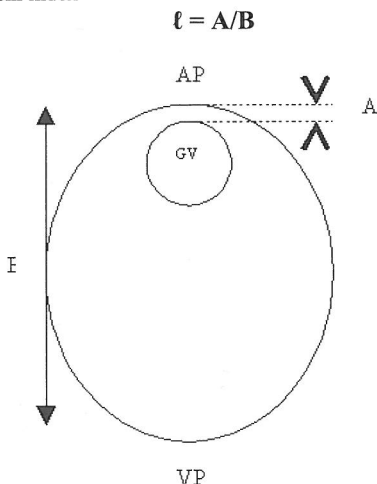
(Schéma 1, Obr. 4, Conte F. S., et al., 1988).

Schéma 1: AP – animální pól, VP – vegetační pól, GV – jádro

A – vzdálenost mezi jádrem a membránou ovocytu

B – průměr ovocytu mezi animálním a vegetačním pólem

ℓ - klasifikační index



Z odebraného vzorku takto analyzujeme alespoň 5 kusů ovocytů a z průměrného výsledku ($\ell_0 = \Sigma \ell / n$, n = počet analyzovaných ovocytů) určíme, je-li jikernačka zralá a připravena k výtěru. V případě hodnoty vyšší ($\ell_0 > 0,10 - 0,15$) než optimum, odběr ovocytů opakujeme po několika týdnech, minimálně však po jednom měsíci. Hodnoty nižší ($\ell_0 < 0,01 - 0,02$) znamenají, že ovocyt jsou přezrálé a oplozenost případné reprodukce nebude vysoká (10 – 20%). V případě přezrálých ovocytů záleží na rozhodnutí managementu líhně, jestli se spokojí s nižším množstvím vykuleného plůdku nebo nechá ovocyt přirozeně resorbovat v těle jikernačky a počká minimálně 2 roky na dozrání nových ovocytů. V případě resorbce je předpoklad snížení relativní plodnosti při následujícím výtěru o cca 5 – 10 %.

Řízená reprodukce ryb

Teplotní stimulace ryb

Vybrané mlíčky a jikernačky umístíme do připravených bazénů, kde zajistíme postupnou temperaci vody (s maximálním denním zvýšením 3 °C) na finální teplotu 14 – 15 °C. Tuto hodnotu udržujeme alespoň 5 - 7 dní před plánovanou hormonální stimulací ryb v případě, že počáteční teplota vody byla kolem 10 °C. Byla-li tato teplota nižší, dobu postupné temperace na optimální teplotu prodloužíme až na 14 dní. Není nezbytně nutné připravovat ryby rozdělené dle pohlaví, ani po hormonální stimulaci mlíčků a jikernaček nedojde ke spontánnímu výtěru v bazénech.

Výtěr mlíčků

Ke stimulaci mlíčků použijeme jednorázovou nitrosvalovou injekci suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku v dávce 4 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Vhodnější je pravá jesetří hypofýza, ale nepředpokládáme, že ji lze legálně a v dostatečném množství koupit. Optimální spermiace se dostaví přibližně po 36 hodinách od injekce při teplotě vody 14 – 15 °C. Ke spermiaci lze použít také jednorázovou nitrosvalovou dávku Kobarelinu [(D-Ala⁶)-GnRH-ProNH₂Et] v množství 50 µg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby nebo Ovopel (savčí GnRH analog + metoclopramid) v dávce 1 peletky.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Při použití hormonálních látek obsahujících GnRH analog spermiace nastává po 20-ti hodinách od injekce (Rzemieniecki et al., 2004). Anestézie mlíčků není nutná a rozhodujeme se pro ni v závislosti na velikosti odebíraných ryb.

Mlíček se uchopí za prsní ploutve a ocasní násadec, položí se hřbetem na výtěrový stůl a osuší se místo pohlavního otvoru. Sperma se odebírá pomocí suché kanyly vhodného průměru (např. pro jesetera malého o průměru 5 mm, kdy vyhovuje běžná akvaristická vzduchovací hadička) o délce alespoň 20 cm s koncem zastříženým do špičky pro snadnější zavádění. Kanyla se zasune do chámovodu a její volný konec se vloží do suché nádoby, např. suchého kontejneru pro buněčné kultury o objemu 50 - 100 ml. Kontejner se drží níže než je tělo ryby a sperma samovolně vytéká (Obr. 5). Kontejner se plní maximálně do 1/3 objemu a nesmazatelným způsobem označí individuálním kódem mlíčka. Při dobré připravenosti ryby není masáž břišní dutiny nutná. Identifikace ryby a množství získaného spermatu v ml se запиše do výtěrového listu. Odebrané sperma lze v uzavřených kontejnerech v aerobních podmínkách uchovávat v chladu a temnu při 0 – 4 °C v horizontální poloze kontejneru po dobu až 72 hodin.

Sperma jeseterovitých ryb je bělavá až mléčně bílá tekutina vodnaté konzistence s koncentrací spermií přibližně 0.01-1x10⁹ v 1 ml a množství od 1 mlíčka se pohybuje v závislosti na druhu a velikosti ryby od jednotek ml (např. jeseter malý) po stovky (jeseter sibiřský) až tisíce ml (vyza, jeseter čínský).

Výtěr jikernaček

Ke stimulaci jikernaček použijeme nitrosvalovou injekci suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku ve dvou dávkách. První dávka je 0,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Po 12-ti hodinách následuje dávka druhá, a to 4,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Ovulace jiker nastává přibližně po 42 hodinách od první dávky suspenze hypofýzy, kdy na dně přípravného bazénu pozorujeme samovolně ovulované jikry.

Ovulující jikernačku přeneseme do připravené lázně s anestetikem roztoku hřebíčkového oleje o koncentraci 0,07 ml.l⁻¹. Pro lepší rozpuštění hřebíčkového oleje naředíme 7 ml hřebíčkového oleje 60 ml 96% ethanolu a následně rozmícháme ve 100 litrech vytemperované vody. Anestézií zmírníme stres jikernačky v průběhu výtěru a vyvarujeme se nečekaného pohybu ryby s nebezpečím jejího zranění při prováděném chirurgickém řezu. Po

naprosté anestézii jikernačku vyzvedneme z lázně, položíme na výtěrový stůl hřbetem dolů a osušíme pohlavní otvor a jeho okolí. Vlastní chirurgický zákrok dle Štěcha a kol. (1999) spočívá v proříznutí vejcovodu v délce 20 mm v místě před vyústěním do pohlavního otvoru a výtěrem jiker klasickým způsobem, tzn. masáží břišních partií (Obr. 7). Výtěr jiker trvá přibližně 10 minut. Při dobře provedeném řezu a výtěru je mortalita jikernaček minimální. Pozdější případnou mortalitu ryby (do 15 dnů) způsobí násilný výtěr neuvolněných ovocytů s poškozením vaječníků nebo poškození jiných vnitřních orgánů doprovázené silným krvácením nebo naopak nedostatečný výtěr dobře ovulovaných ovocytů. Ovulované ovocyty, které nevytřeme a které zůstanou v těle, po několika hodinách přezrají a začnou se rozpadat, což způsobí sepsi jikernačky a její následný úhyn.

Jikry se vytírají do předem zvážených suchých misek. Vytřené jikry mají v závislosti na druhu šedočernou až černou barvu a obvykle dobře zřetelný animální pól. Jikry jsou uvolňovány spolu s viskózní ovariální tekutinou. Získané jikry se zváží a misku překrytou čistou vlhkou utěrkou umístíme do stínu a teploty okolního prostředí 13-15 °C. Veškeré hmotnostní údaje s identifikačním kódem ryby se zaznamenávají do výtěrových listů. Je možné očekávat získání jiker na úrovni 10 – 15% hmotnosti vytíraných jikernaček.

Oplození, aktivace a odlepkování jiker

Metodika oplození a aktivace pohlavních produktů u chrupavčitých ryb se liší od metodiky zatížené u ryb kostnatých. Hlavní rozdíl spočívá v posloupnosti procesu. U chrupavčitých ryb se nejprve smísí a aktivuje v určitém poměru připravené sperma s vodou a poté se aktivovanými spermii oplozují jikry. Důvodem tohoto postupu je přítomnost většího počtu mikropylů na animálním pólu zralé jikry (u veslonose amerického *P. spathula* je jich 4 – 12), kudy proniká spermie do jikry (Linhart a Kudo, 1997). Použitím naředěného spermatu se předchází polyspermii (oplození jikry větším počtem spermii) a tím embryonální mortalitě a vzniku abnormalit při vývoji embryí.

K oplození a aktivaci jiker se použije 20 – 25 ml heterospermatu od mlíčáků s nejkvalitnějším spermatem. Toto množství se rozředí čtyřmi litry aktivací vody (voda z líhne o teplotě 15 °C) a okamžitě nalije do 1000 g vytřených jiker (z nichž bylo odstraněno co největší množství ovariální tekutiny). Následuje důkladné promíchání jiker rukou tak, aby se jikry uvolnily ze zbylé viskózní ovariální tekutiny (Obr. 8). Po 3 minutách se přidá malé množství odlepkovací suspenze a jikry se další minutu míchají. Následuje slití přebytku tekutiny z jiker a 3x opakovaným propláchnutím vodou s malým množstvím odlepkovací suspenze. Účelem je odstranit přebytečné spermie a zabránit polyspermii. Vlastní odlepkování jiker dále trvá minimálně 60 minut. Jako odlepkovací suspenzi použijeme rozpuštěné plnotučné sušené mléko 1 : 30 nebo suspenzi jílu (Gela et al., 2003). Odlepkování ukončíme vypláchnutím odlepkovací suspenze z misek větším množstvím vody. Kvalitně ošetřené a čisté jikry jsou vysazeny na inkubační aparát.

Inkubace jiker

Inkubace jiker může probíhat na všech běžných typech inkubačních lahví nebo aparátech (Obr. 9 a,b,c,d) při teplotě vody (v závislosti na druhu ryby) 13,5 – 17,0 °C. Průtok vody lahvemi je seřízen tak, aby docházelo k pozvolnému „vlnění a přelévání“ jiker.

K prevenci a tlumení výskytu plísňových onemocnění jiker používáme prostředky běžné v líhnařské praxi (UV lampy, ozonizace) (Liltved, 2003). Ke krátkodobým koupelím jiker lze použít Jodisol (účinná látka poly-N-vinylpyrrolidon-2) v koncentraci 5 – 10 ml.l⁻¹ při délce koupele 2 minuty (Kouřil a Hamáčková, 1998) nebo roztok Acriflavinu v dávkování dle návodu výrobce (možno běžně koupit v akvaristických potřebách).

Odsávání uhynulých jiker v průběhu inkubace se neprovádí, protože není markantní rozdíl v barvě mezi živou a mrtvou jikrou. Provádí se odstraňování zaplísňených jiker, čištění od rozpadlých jiker a jejich obalů.

Líhnutí u jeseterů neprobíhá hromadně a v krátkém časovém intervalu jako u teplomilných druhů ryb, ale poměrně dlouho po dobu 2 – 3 dnů (Tab. 5). Vykulený plůdek velice ochotně odplouvá s vodou, čehož využíváme při přeplavování plůdku z inkubačních lahví opatřených gumovým límcem s trubicí do odchovného žlabu (Obr. 10). Mrtvé jikry a neživotný plůdek zůstane u dna inkubační láhve a ze žlabu případné přeplavené obaly jiker odsajeme.

Tab. 5: Inkubační doba jiker jesetera malého a sibiřského od oplození (v hodinových stupních h° – t.j. násobek počtu hodin a průměrné hodinové teploty vody).

Druh	Inkubační doba do začátku líhnutí (h°)	Inkubační doba do konce líhnutí (h°)
jeseter malý	1750	2350
jeseter sibiřský	2000	2800

Záchranný chov jesetera čínského

V letech 2005 a 2006 autoři této Metodiky společně s Dr. Jacky Cossonem z pařížské univerzity přijali pozvání k pracovní návštěvě do laboratoře biotechnologií a ochrany zárodečných buněk sladkovodních ryb, ministerstva zemědělství v Jingzhou City na řece Yangtze ve střední Číně. Cílem cesty byla spolupráce při výzkumu a záchraně endemického jesetera čínského (*Acipenser sinensis*). Tento druh jesetera dorůstá 4 m délky, dosahuje hmotnosti 550 kg a dožívá se 50-ti let.

V červnu začíná 3000 km dlouhá pouť pohlavně zralých ryb proti proudu řeky završená přirozeným výtěrem v průběhu října a listopadu při teplotě vody 15 – 20 °C (Hochleithner, 2004). Od roku 1992 je tah jeseterů na trdlíště přerušen vybudováním největší přehrady světa „Tři soutěsky“ na řece Yangtze, jejíž hráz je dlouhá 2039,5 m a vysoká 185 m (Obr. 11).

Výskyt dospělců jesetera čínského v řece Yangtze je poměrně nízký. V roce 2006 se čínským rybářům podařilo ulovit v oblasti Třech soutěsek pouze čtyři jikermačky (Obr. 13a, b) a dva mlíčky tohoto druhu jesetera, u kterých jsme asistovali při umělé reprodukci (Obr. 14). Celkem bylo z výtěru získáno 75 kg jiker (1 275 000 ks). Inkubace jiker a odchov potomstva probíhá v řízeném prostředí rybí líhně Taihu Lake v Jingzhou City v provincii Hubei (Obr. 12). Tato rybí líheň byla vybudována na počátku 80. let minulého století a je specializována pouze na řízenou reprodukci a odchov jesetera čínského.

Jikry tohoto druhu jesetera jsou jedny z největších mezi jeseterovitými. V 1 g se jich nachází 17,6 ks. Zdejší rybáři využívají tzv. suchou metodu osemenění, tzn. smísí 3 ml spermatu s 1 kg jiker a následně aktivují vodou. Po oplození jiker odlepkovávají suspenzí jílu po dobu 40 min (Obr. 15) s promytím jiker a vysazením do inkubátorů (Obr. 9b, c). Inkubace probíhá 5 dnů při 20 °C (2400 h°). Odchované potomstvo ve věku 2 měsíců (3 – 10 g/ks) a jednoho roku (50 cm) je vysazováno zpět do řeky Yangtze a jejich přítoků (Tab. 6).

Tab. 6: Nasazování remontů jesetera čínského (*Acipenser sinensis*) v letech 1983 – 2005 do Yangtze River a přítoků (Wildlife Treasure of China, 2006).

Rok	Váčkový plůdek (ks)	ks ryb (3 – 10 g/ks)	ks ryb (6 – 14 měsíců stáří)
1983	20000	0	0
1984	6000	490	0
1985	87000	0	0
1986	792000	0	0
1989	120000	0	0
1992	130000	0	0
1993	100000	0	0
1994	80000	0	0
1997	50000	0	1000
1998	100000	37000	300
1999	0	70917	300
2000	0	66200	200
2001	0	0	3000
2002	0	75000	7200
2004	0	40000	10200
2005	0	10000	37000
Celkem	1485000	299607	58900

Použitá literatura

- Altuf'ev, Y., 1997. Morphofunctional abnormalities in the organs and tissues of the Caspian sea sturgeons caused by ecological changes, same volume. 1997. In: Birstein, V.J., Bauer, A., Kaiser-Pohlmann, A. (eds.). Proceedings of the Sturgeon Populations and Caviar Trade Workshop, IUCN SSC p. 81.
- Conte, F.S., et al., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon, Div. of Agricul. and Natural Resources University of California, USA, 1 - 103.
- Debus, L., 1997. Sturgeons in Europe and causes in their decline. In: Birstein, V.J., Bauer, A., Kaiser-Pohlmann, A. (eds.). Proceedings of the Sturgeon Populations and Caviar Trade Workshop, IUCN SSC Paper No. 17: 55 - 68.
- Doroshov, S.I., Binkowski, F.P., 1985. Epilogue: a perspective on sturgeon culture In: Binkowski, F.P., Doroshov, S.I. (eds.). North American Sturgeons. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Fontana, F., et al., 2008. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *A. sturio* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. Genetica, 132:281 - 286.
- 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 Appl. Ichthyol., 19: 132 - 133.
- Gela, D., M., Flajšhans, M., Kocour, M., Rodina, M., Linhart, O., 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture. Aquaculture International, 14: 195 - 203.
- Hochleithner, M., 2004. Störe – Biologie und Aquakultur. AquaTech Publications, p. 9 - 222.
- Hung, S.S.O., 1991. Nutrition and feeding of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): an overview. In: Williot, P.(ed.) *Acipenser*. Cemagref.
- Kazanskii, B.N., Feklov, Yu.A., Podushka, S.B., Molodsov, A.N., 1978. Express method for determining the degree of gonad maturity in sturgeon spawners. Rybnoe Khozajstvo 2: 24 - 27.
- Kolman, R., 2008. Restytucja jesiotra bałtyckiego. prenáška VÚRH JU Vodňany.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., 1998. Použití Jodisolu k prevenci mykóz jiker kaprovitých a některých dalších druhů ryb. Edice metodik, 55: 2 - 3.
- Linhart, O., Kudo, S., 1997. Surface ultrastructure of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) eggs before and after fertilization. J. Fish Biology, 51: 573 - 582.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). Edice metodik, 64: 1 - 15.
- Liltved, H., 2003. Dezinfekce vody v akvakultuře. Edice metodik, 71: 1 - 12.

- Ludwig, A., Debus, L., Lieckfeldt, D., Wirgin, I., Benecke, N., Jenneckens, I., Williot, P., Waldman, J.R., Pitra, C., 2002. When the American sturgeon swam east. *Nature* 419: 447 - 448.
- Rodina, M., 2006. Application of image analysis for the determination of nucleus position in sturgeon oocytes. *Journal of Appl. Ichtyol.*, 22: 175 - 176.
- Rochard, E., Williot, P., Castelnaud, G., Lepage, M., 1991. Elements de systematique et de biologie des populations sauvages d'esturgeons. In *Acipenser*, Cemagref publ., 475 - 507.
- Rzemieniecki, A., Domagała, J., Glogowski, J., Ciereszko, A., Trzebiatowski, R., Kouřil, J., Hamáčková, J., Babiak, I., 2004. Induced spermiation in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research*, 35: 144 - 151.
- Saffronová, I., 2004. Kaviár – fascinující cesta za utajenými dějinami kaviáru. *BB/art s.r.o.*, 42.
- Speer, L., 2000. Roe to Ruin: The Decline of Sturgeon in the Caspian Sea and the Road to Recovery. www.seaweb.org, 1 - 4.
- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W.L., Mims, S.D., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs from paddlefish (*Polyodon spathula*). *Aquaculture International*, 7: 129 - 133.
- Tiedemann, R., Moll, K., Paulus, K.B., Scheer, M., Williot, P., Bartel, R., Gessner, J., Kirschbaum, F., 2007. Atlantic sturgeons (*Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. *Naturwissenschaften* 94: 213 - 217.
- Wei, Q., W., Yang, D. G., Kynard, B., Chen, X. H., Liu, J. Y., Zhu, Y. Y., 2006. Reproduction of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) since the completion of Gezhouba dam: timing and locations (J). *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 4 - 6.
- Wildlife Treasure of China, 2006. Chinese sturgeon, propagační brožura.
- Williot, P., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D., 2001. Preliminary succesful results in larval rearing of the endangered western European sturgeon, *A. sturio*, allowing the initiation of restocking and further conservative rearing program. 4th International symposium on sturgeon, Extended Abstracts, AQ61, Oshkosh, Wisconsin, USA.

www.env.cz, Příloha CITES I, II.
www.fao.org
www.wscs.info

Poděkování:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného záměru č. MSM 600766809 a projektu NAZV MZe QH 71305.

Lektoroval:

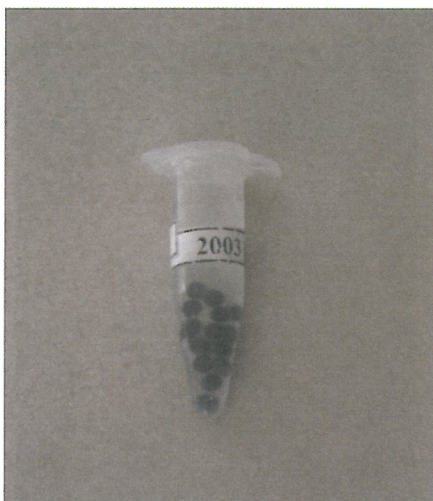
Ing. Luděk Štěch, Alcedor, s.r.o., U stadionu 502, Zliv 373 44, e-mail stech@kapr-koi.cz

Adresy autorů:

Ing. David Gela, Ph.D., Ing. Marek Rodina, prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, oddělení genetiky a šlechtění ryb se šlechtitelskou stanicí, 389 25 Vodňany.
e-mail: gela@vurh.jcu.cz



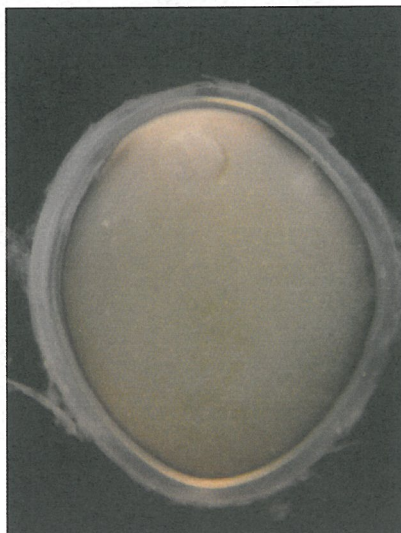
Obr. 1: Biopsie gonád jesetera malého (*A. ruthenus*) pomocí trokaru vedeného kranio-mediálním směrem v břišní partii před bází břišní ploutve.



Obr. 2: Umělohmotná zkumavka typu Eppendorf o objemu 1,5 ml se vzorkem ovocytů fixovaných v Sérově roztoku.



Obr. 3: Rozříznutí fixovaného ovocytu v podélné rovině žiletkou.



Obr. 4: Optimálně zralá jikra jesetera malého se zřetelně viditelným jádrem.



Obr. 5: Odběr spermatu jesetera malého pomocí kanyly do kontejneru o objemu 50 ml. Vlastní odběr trvá maximálně 1 minutu.



Obr. 6: Výtěr jikernačky jesetera malého (po proříznutí vejcovodu mikročirurぎickou metodou).

a



b



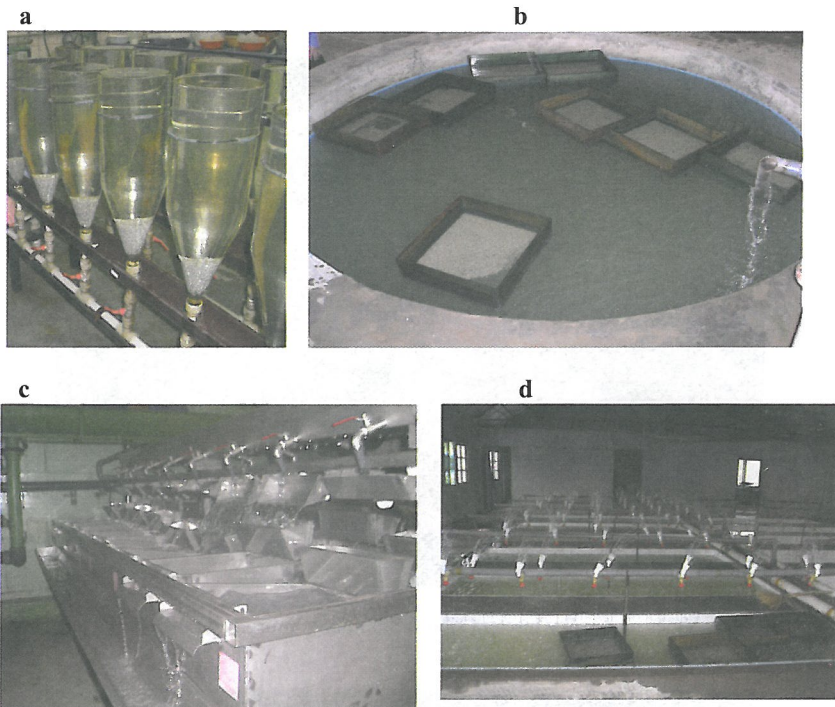
c



Obr. 7 a, b, c: Výtěr jikernačky jesetera sibiřského mikrochirurgickou metodou s proříznutím vejcovodu.



Obr. 8: Oplození jiker s pomalým promícháváním a postupným přidáváním odlepkovací suspenze.



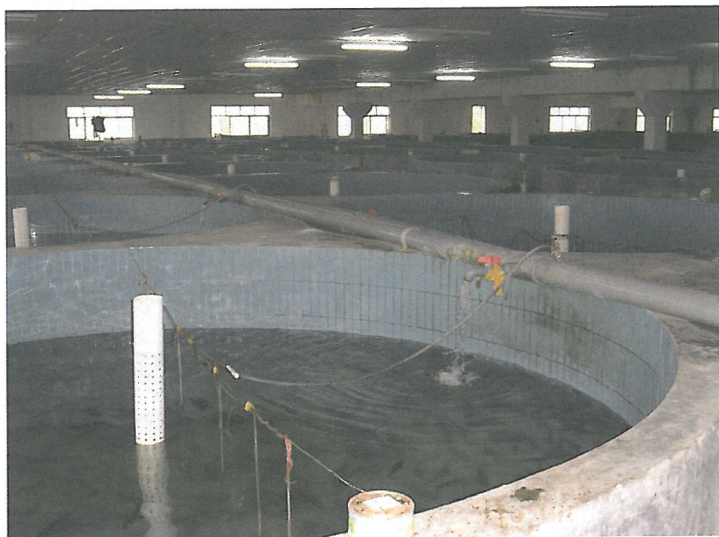
Obr. 9: **a** – Inkubace jiker v Zugské láhvi,
b – Inkubace jiker jesetera čínského (*Acipenser sinensis*) v kruhovém bazénu, kde jikry jsou umístěny do aparátů v jedné vrstvě a rotační pohyb přitékající vody způsobuje pomalé plavání aparátů s promýváním jiker (líheň Taihu Lake, Jingzhou City, provincie Hubei, Čína, 2006),
c – Inkubace jiker u aparátů se „sprchováním“ hladiny vody nad jikrami (líheň Taihu Lake, Jingzhou City, provincie Hubei, Čína, 2006).
d – Inkubace jiker v aparátech typu „OSJETR“ (rybí farma Fischzucht Peter und Udo Groß GmbH & Co. KG, Německo).



Obr. 10: Přeplování plůdku jesetera do odchovného žlabu.



Obr. 11: Největší přehrada světa „Tři soutěsky“ na řece Yangtze.



Obr. 12: Kruhové bazény rybí líhně Taihu Lake pro odchov jesetera čínského (*Acipenser sinensis*). Těchto bazénů o průměru 3 m je v hale 120.

a



b



Obr. 13a, b: Přeprava a vysazení jikernačky jesetera čínského (330 kg, 3,5m délky) do přípravného bazénu.



Obr. 14: Vlastní výtěr jikernačky jesetera čínského



Obr. 15: Odlepkování jiker v suspenzi jílu.

V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. - Náklad 100 ks – Technická realizace: PTS spol. s r.o. Vodňany – Předáno do tisku: květen 2008

