

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz

PRODUKCE A VYUŽITÍ TRIPLOIDŮ U OKOUNOVITÝCH RYB

Policar T., Křišťan, J., Dadras H. D., M. Flajšhans

č. 179

Vodňany

2019

ISBN 978-80-7514-097-5

**Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu Rybářství 2014–
2020:**

Metodika III č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/19_014/0000886.

NAZV projekt QK1710310 Využití nových biotechnologických postupů v podmínkách české akvakultury s cílem dosáhnout efektivní, kvalitní a ekologicky šetrné produkce ryb – 70 %

MŠMT projekt CENAKVA (LM2018099) – 15 %

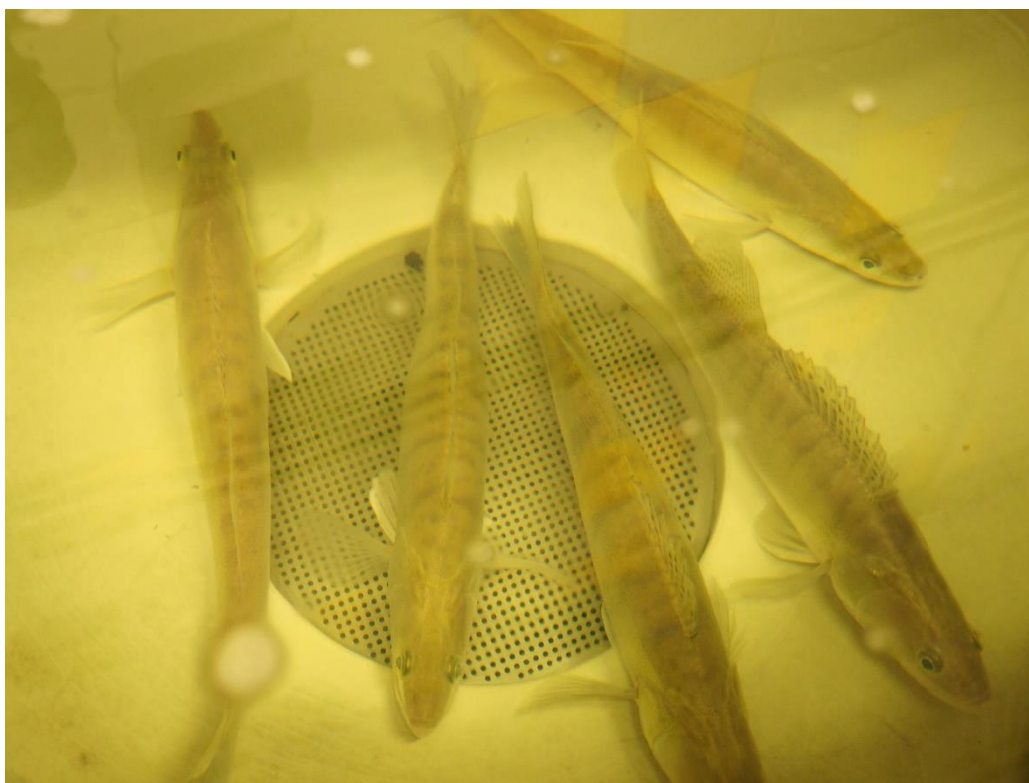
MŠMT projekt Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) – 15 %

Obsah

1 Úvod	4
2 Cíl	5
3 Obecný princip řízené produkce triploidních ryb a jejich uplatnění v akvakultuře	6
4 Metody využívané ke stanovení ploidní úrovně u ryb	10
4.1 Přímé metody	11
4.1.1 <i>Stanovení karyotypu</i>	11
4.1.2 <i>Kvantifikace obarvených jadérek v buňkách</i>	11
4.1.3 <i>Kvantifikace obsahu DNA v buněčných jádrech</i>	11
4.2 Nepřímé metody	13
5. Produkce a využití triploidů u okounovitých ryb	13
5.1 Produkce a využití triploidních ryb u okouna říčního a okouna žlutého	14
5.2 Produkce a využití triploidních ryb u candáta obecného a severoamerických druhů candátů	15
5.3 Závěrečné shrnutí nejúspěšnějších variant fyzikálních šoků při indukci triploidie u okounovitých ryb	18
6. Srovnání „Novosti postupů“	19
7. Popis uplatnění certifikované metodiky	19
8. Ekonomické aspekty	19
9. Seznam literatury	19
10. Seznam literatury, která předcházela metodice	22

1 Úvod

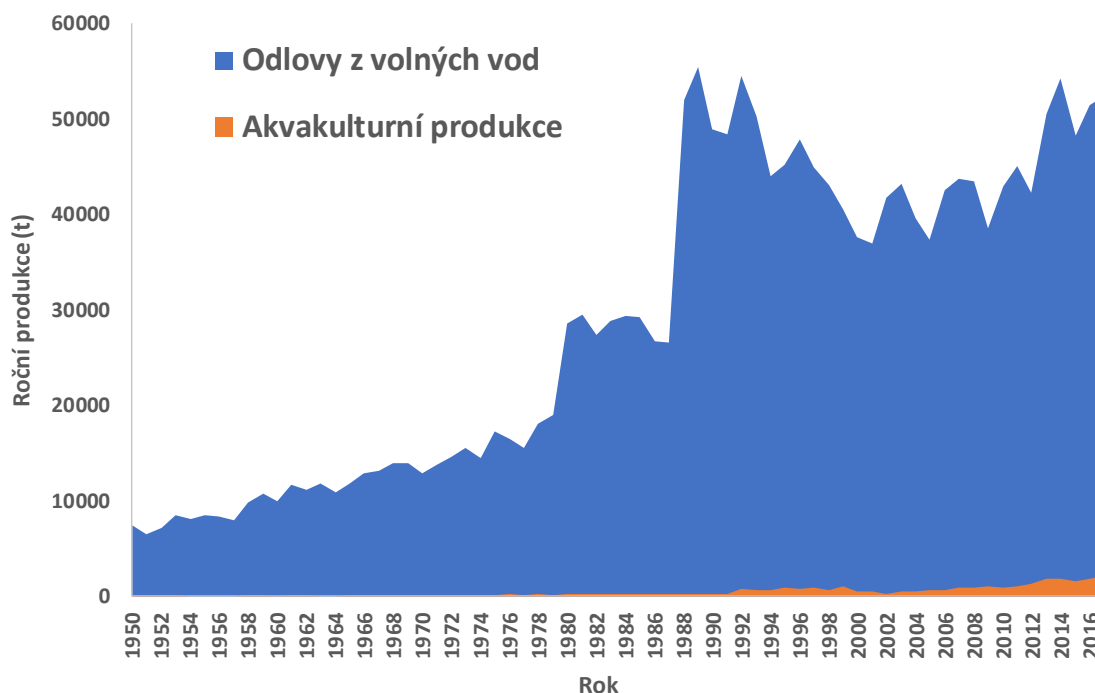
V posledních dvou desetiletích se v Evropě intenzivně rozvíjí a optimalizuje chov okouna říčního (*Perca fluviatilis*) a candáta obecného (*Sander lucioperca*), který zajišťuje zvyšující produkci tržních či násadových ryb zmíněných druhů (Polícar a kol., 2019a). V souvislosti s touto skutečností můžeme sledovat postupně rozvíjející se trh s těmito druhy hlavně v zemích jako je Švýcarsko, Francie, Německo, Irsko, Belgie, Holandsko, skandinávské a středoevropské země (Toner, 2015). Průmyslový chov okouna říčního a candáta obecného založený na rybníční či intenzivní akvakultuře (Obr. 1) má v dnešní době zvyšující se význam v produkci tržních ryb (Polícar a kol., 2019a). Hlavním důvodem je skutečnost, že divoké populace těchto ryb jsou ve svých přirozených lokalitách (jezera, přehrady, rybníky, velké řeky či jejich delty) extrémně loveny jak ze strany komerčních rybářských společností, tak i ze strany rekreačních rybářů (Obr. 2; Dil, 2008; Olin a kol., 2018). Bez dostatečně zvládnutého managementu ochrany a obnovy tamních populací dochází k nadměrnému využívání daných rybích druhů a následnému výraznému a kontinuálnímu snižování jejich stavů (Hladík, 2015). Ryby v takovýchto populacích ztrácejí možnost se přirozeně rozmnožovat, obnovovat stavy a dosahovat dřívější hustoty výskytu či produkce (Slavík, 2015; Olin a kol., 2018).



Obr. 1. Intenzivní chov candáta obecného (*Sander lucioperca*) v recirkulačním akvakulturním systému (Foto: T. Polícar).

Perspektiva každého podniku zabývajícího se chovem ryb je závislá na úspěšnosti, efektivitě a rentabilitě produkce ryb a také na marketingu a způsobu prodeje vyprodukovaných ryb. Je zřejmé, že v budoucnosti v rámci celosvětového konkurenčního boje na trhu s rybami či rybími výrobky uspějí jen podniky, které budou mít efektivní, rentabilní, diverzifikovanou, kontinuální a vysoce kvalitní produkci s nízkými produkčními náklady, krátkým produkčním intervalem a vysokou přidanou hodnotou. Jen takové podniky totiž mohou v budoucnosti dosahovat

vysokého zhodnocení své produkce a následné rentability (Overton a kol., 2015; Policar a kol., 2019b).



Obr. 2. Celková roční produkce okounovitých ryb v Evropě (okouna říčního – *Perca fluviatilis a candata* obecného – *Sander lucioperca*) získaných odlovem z divokých populací a produkcí akvakultury v období od 1950 do 2016 (Policar a kol., 2019a).

Chov zmíněných okounovitých ryb v ČR, potažmo v Evropě, nabízí produkčním podnikům možnost diverzifikovat svojí produkci o vysoce kvalitní rybí druhy, které jsou na současném trhu poměrně vysoce ceněny. Cena dosahuje 150 – 350 Kč za kg živé ryby nebo až 800 - 1 600 Kč za 1 kilogram čerstvých nezamražených filet. Navíc velmi často je této gastronomické suroviny na trhu nedostatek a to v průběhu celého roku. Současně jsou okoun říční a candát obecný poměrně často poptáváni a obchodováni v podobě násadového materiálu, který se vysazuje do volných vod (Policar a kol., 2016, 2017), a následně využívání ke sportovnímu rybolovu či při biomelioračním procesu (především ve vodárenských či údolních nádržích) k eliminaci výskytu kaprovitých ryb (Adámek a kol., 2008). Oba dva druhy je možné chovat jak v rybníční, tak i v intenzivní akvakultuře či kombinací těchto technologií (Policar a kol., 2013, 2019a).

2 Cíl

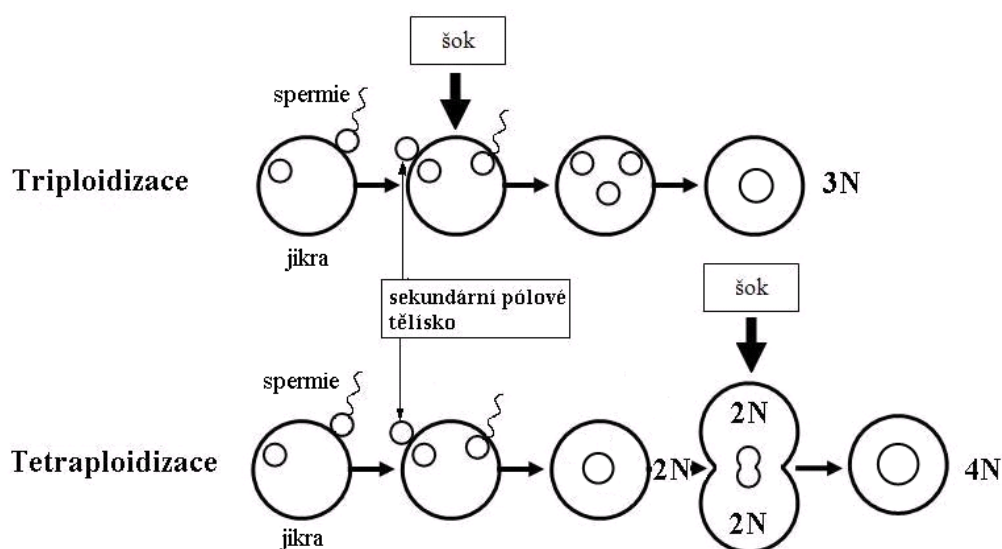
Cílem této certifikované metodiky je detailně sumarizovat jednotlivé technologické postupy vedoucí k efektivní produkci triploidních okounovitých ryb, které by se následně mohly potencionálně a efektivně využívat v produkční akvakultuře České republiky, potažmo Evropy, či při jejich vysazování do rybářských revírů.

3 Obecný princip řízené produkce triploidních ryb a jejich využití v akvakultuře

Naprostá většina živočichů má v somatických buňkách duplikovanou sadku chromozómů, tedy $2n$. Tento stav se nazývá diploidie. V pohlavních buňkách takovýchto živočichů je díky redukčnímu dělení během gametogeneze přítomna jen jedna sada chromozómů. Tato skutečnost je nazývána haploidním stavem ($1n$). Následně při pohlavním rozmnožování je splynutím samičí a samčí gamety znovu nastolen diploidní stav nového organismu v rámci další generace (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013; Stabińska a kol., 2016).

Vedle diploidních jedinců existují i jedinci polyploidní, kteří mají ve svých somatických buňkách díky různým biotickým či abiotickým procesům zmnožené celé chromozomové sady ($3n$, $4n$ a více) a nazýváme je triploidními, tetraploidními či víceploidními živočichy (Thorgaard, 1986). Polyploidie u ryb je důležitým evolučním mechanismem, který přispěl k velké rozmanitosti současných druhů ryb. Uměle navodit polyploidní stav ryb pomocí fyzikálního (teplotního nebo tlakového) či chemického (působením vřetenkových jedů jako je kolchicin, kolcemid, cytochalazin B a další) zásahu v průběhu 2. fáze meiózy po oplození či později v mitotickém dělení je relativně snadné. Tento proces se obecně nazývá polyploidizace a zmíněné fyzikální nebo chemické zásahy jsou obecně nazývány šoky. Nejčastěji se u ryb využívá triploidizace, čili postup vyvolávající triploidní stav (Flajšhans a kol., 2013), nebo tetraploidizace s cílem získat ryby se čtyřmi sadami chromozómů v somatických buňkách. Tetraploidní ryby, které mají diploidní gamety, se následně využívají ke křížení s diploidními rybami, což vede k dalšímu způsobu produkce triploidních ryb (Rougeot a Mélard, 2008a,b; Piferrer a kol., 2009; Policar a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

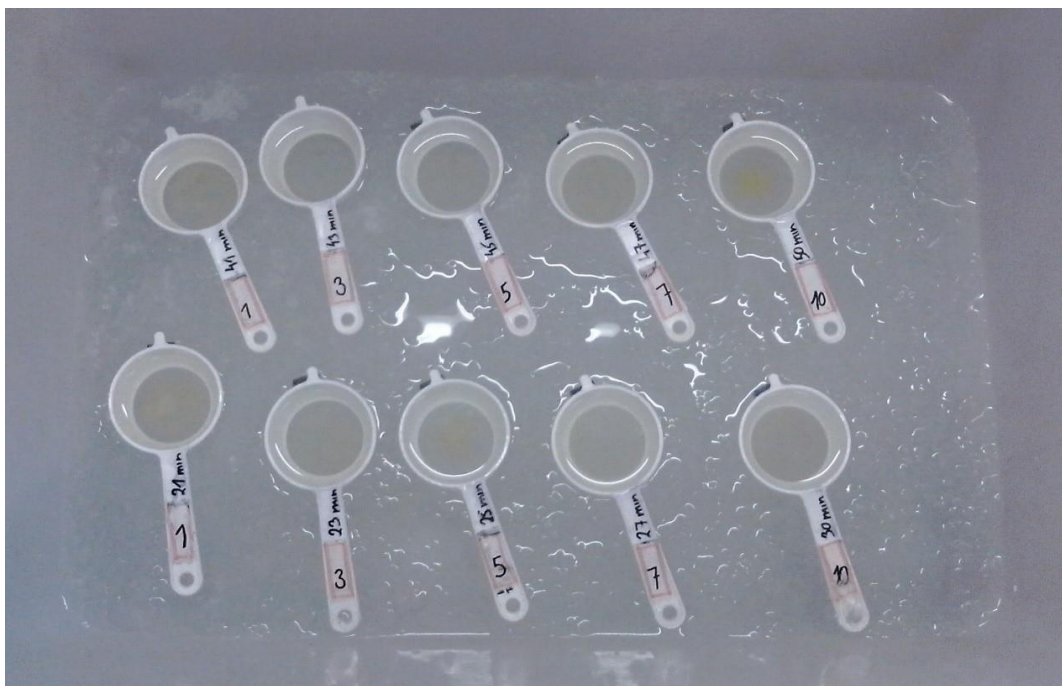
Šokový zásah při indukci triploidie musí postihnout zmíněné období 2. fáze meiózy, kdy dochází k zabránění oddělení 2. pólového tělíska depolymerací jeho tubulinových vláken. Po takovémto ošetření má vylíhlá larva tři sady chromozómů. Jedna sada pochází ze samičího prvojádra, druhá sada ze sekundárního pólového tělíska a třetí ze samčího prvojádra. Šok vedoucí k indukci tetraploidie musí postihnout cytokinezi 1. mitotického dělení. V této fázi dělení dochází k zabránění rozdělení duplikovaných sad chromozómů do dceřiných buněk (blastomer) depolymerací tubulinových vláken vřetenka. Výsledkem takového šoku jsou vylíhnuté larvy se čtyřmi sadami chromozómů, kdy dvě sady pochází ze samičího a další dvě ze samčího prvojádra (Obr. 3; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).



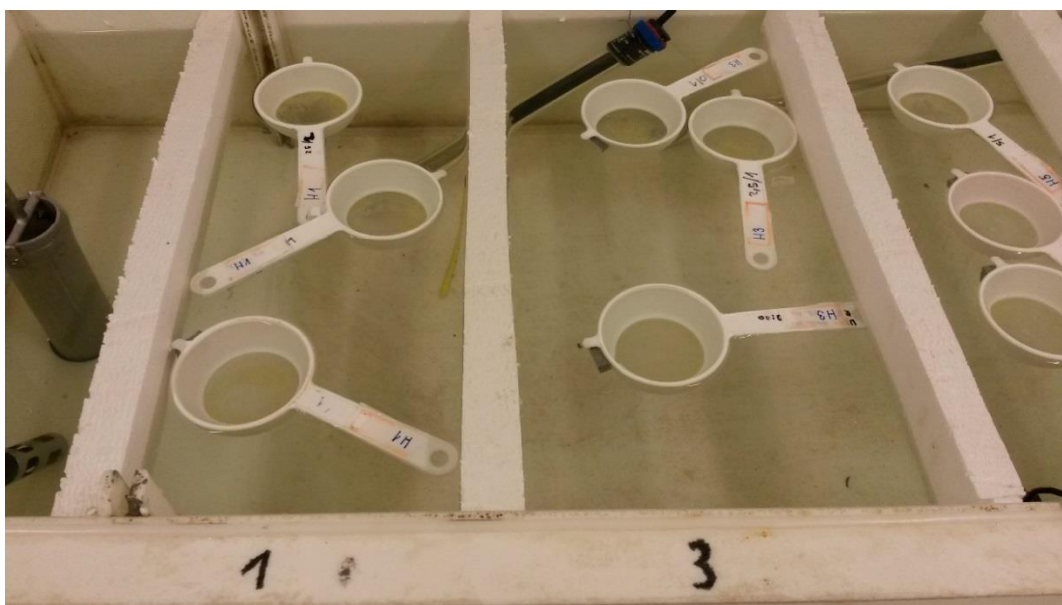
Obr. 3. Schéma indukce triploidie a tetraploidie podle Policara a kol. (2009).

Vedle řízené produkce triploidních ryb je možné se setkat se spontánním výskytem triploidních jedinců v nové vznikající populaci u celé řady komerčně využívaných druhů, jako jsou např. sumec velký – *Silurus glanis* (Varkonyi a kol., 1998), pstruh duhový - *Oncorhynchus mykiss* (Aegerter a Jalabert, 2004), lín obecný – *Tinca tinca* (Flajšhans a kol., 2007), jeseter bílý – *Acipenser transmontanus* (Drauch Schreier a kol., 2011), jeseter malý – *A. ruthenus* (Havelka a kol., 2013), jeseter sibiřský – *A. baerii* (Havelka a kol., 2014), losos obecný – *Salmo salar* (Glover a kol., 2015), štika obecná – *Esox lucius* (Samarin a kol., 2016), candát obecný (Samarin a kol., 2015), siveni – *Salvelinus* spp. (Schwinger a kol., 2018). Důvodem je delší *in vitro* uchování neoplozených jiker v průběhu období od ovulace do vlastního osemenění jiker v rámci umělých výtěrů. I zde dochází k chybnému dokončení II. meiotického dělení a nedojde k oddělení 2. polárního tělíska. Po oplození haploidní spermií tak vzniká spontánní triploidní jedinec (Flajšhans a kol., 2013). Většina výše uvedených autorů také zmiňuje výskyt malformovaných larev (larvy s morfologickými vadami), aneuploidních a jedinců s buněčným mosaicismem (tedy jedinců s neúplným počtem chromozomů v buňkách nebo jedinců s buňkami různé ploidní úrovně, jako $2n/3n$, $2n/4n$ aj.).

V chovatelské praxi se k umělé indukci triploidie nejčastěji používá teplotních (teplých či chladových; Obr. 4 a 5) nebo tlakových šoků (Obr. 6) po oplození a aktivaci gamet v průběhu umělých výtěrů různých hospodářsky významných druhů ryb. Naopak chemické šoky s cílem dosáhnout triploidie u ryb se v současnosti prakticky vůbec nevyužívají (Piferrer a kol., 2009; Rougeot, 2015). Realizace teplotního (teplého či chladového) šoku je provozně poměrně jednoduchá. Je potřeba pouze lázeň při šoku zchladit (pomocí šupinkového ledu či výkonného chladiče) či ohřát (pomocí ohřívače s elektrickou spirálou a termostatem) na požadovanou teplotu, která musí být konstantně udržována po celou zvolenou dobu šoku. Realizace tlakového šoku je technicky složitější, jelikož pro toto ošetření je nutné využít speciální tlakové jednotky. Do komory tlakové jednotky, částečně naplněné vodou, se nalijí oplozené jikry (předem zbavené lepivosti, je-li to u daného druhu relevantní) a komora jednotky se následně kompletně doplní vodou, uzavírá a tlakuje na hydrostatický tlak 52 – 85 MPa pomocí kompresoru, ruční pumpy nebo připojených lahví s tlakovým plynem. Komerčně vyráběné tlakové nádoby o objemu 5 – 10 litrů je možné zakoupit ve Francii, Kanadě nebo USA (Flajšhans a kol., 2013). V České republice byl v roce 2012 zaregistrován užitečný vzor na tlakovou jednotku sloužící k indukci polyploidie u ryb (Flajšhans a kol., 2012).



Obr. 4. Realizace chladového šoku u candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) (Foto: M. Blecha).



Obr. 5. Realizace teplého šoku u candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) (Foto: M. Blecha).



Obr. 6. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb změnou hydrostatického tlaku (Foto: M. Flajšhans).

Realizace a efektivita každého šoku, který indukuje triploidii, jsou dány třemi proměnnými faktory. Kombinace jejich hodnot je zásadní pro dosažení podílu triploidních ryb v získané populaci s cílem dosáhnout maximálního procenta přežití vylíhlých larev bez morfologických a vývojových deformit. Finální efektivita triploidizace je následně vyjadřována tzv. výtěžností triploidů, která se zjistí z dosaženého podílu triploidních ryb v populaci a procenta přežití embryí či larev. Zmíněnými proměnnými faktory ovlivňující efektivitu triploidizace jsou:

- čas zahájení šoku po aktivaci gamet,
- intenzita šoku (hodnota použité teploty vody či tlaku)
- expozice (délka trvání) šoku.

U teplomilných druhů ryb se šok aplikuje 2 – 7 minut po oplození jiker a u studenomilných druhů je to 15 – 20 minut po oplození jiker. U ryb pocházejících z mírného pásma se šok zahajuje (4) 5 – 7 minut po oplození jiker.

Intenzita tlakového šoku je 58 – 85 MPa, u chladového šoku je to -1 až +4 °C a u teplého šoku 24 – 32°C v případě studenomilných ryb, 28 – 30°C u ryb pocházejících z mírného pásma a 34 – 41°C u teplomilných ryb. Obecně lze konstatovat, že teplota šoku se pohybuje v rozmezí o 15 – 20°C nižším (u chladových šoků) nebo vyšším (u teplých šoků), než je fyziologické rozmezí teplot pro oplození a inkubaci jiker daného druhu.

Délka expozice u tlakového šoku se využívá na úrovni 2 – 6 minut u studeno- a teplomilných druhů. Ovšem u druhů pocházejících z mírného pásma může tlakový šok trvat od 12 do 30 minut. Chladový šok je aplikován u teplomilných ryb po dobu 2 – 20 minut. U studenomilných je délka chladového šoku 35 minut až 3 hodiny a u ryb z mírného pásma chladový šok trvá 1,5

– 2 hodiny. Teplý šok se u teplomilných ryb aplikuje po dobu 45 sekund až 3,5 minut. U studenomilných druhů a ryb pocházejících z mírného pásma je délka teplého šoku 10 – 25 minut (Flajšhans a kol., 2013). Zmíněné informace přehledně znázorňuje tabulka publikovaná Piferrerem a kol. (2009) a Flajšhansem a kol. (2013), která je v této certifikované metodice ještě doplněná o informace z optimalizace indukce triploidie u okounovitých ryb. Při optimalizaci indukce triploidie okounovitých ryb je nutné si uvědomit, že okounovité ryby nejsou typickými studeno- či teplomilnými druhy a tvoří jakýsi přechod mezi oběma skupinami. Často jsou tyto druhy ryb právě označovány jako ryby pocházející z mírného pásma, kdy optimální teplota vody pro reprodukci u těchto druhů se pohybuje na úrovni 10 – 16°C (Malinovskiy a kol., 2018), ale optimální teplota vody pro růst se pohybuje v rozmezí od 22 do 25°C při 100 % nasycení vody kyslíkem (Policar a kol., 2013, 2016, 2019).

Tab. 1. Rozmezí hodnoty jednotlivých proměnných faktorů využívaných k indukci triploidie u ryb. Upraveno podle Piferrera a kol. (2009) a Flajšhanse a kol. (2013).

Typ šoku	Typy ryb	Zahájení šoku po aktivaci gamet	Intenzita šoku	Délka šoku
Teplý	studenomilné	15 – 20 min.	24 – 32°C	10–25 min.
	mírného pásma	5 – 7 min.	28 – 30 °C	10–25 min.
	teplomilné	2–7 min.	34 – 41°C	45 s–3,5 min.
Chladový	studenomilné	15 – 20 min.	-1,7 – +0,5°C	35 min.–180min.
	mírného pásma	5 – 7 min.	-1 – +2°C	90–120min.
	teplomilné	2 – 7 min.	-1 – +4°C	2–20 min.
Tlakový	studenomilné	15 – 20 min.	62 MPa (od 58 – 85 MPa)	2–6 min.
	mírného pásma	4 – 5 min.	62 MPa (od 48 – 76 MPa)	12 – 30 min.
	teplomilné	2–7 min.	62 MPa (od 58 – 85 MPa)	2–6 min.

Triploidní ryby se v komerčních chovech ryb využívají z několika následujících důvodů, které představují významné produkční výhody. Hlavní výhodou triploidů v produkčních chovech je jejich úplná či částečná sterilita. Jestliže je tržní velikost chovaných ryb dosahována až po dovršení pohlavní dospělosti (u okounovitých ryb již v prvním či druhém roce života), velmi často triploidní ryby takovýchto druhů dosahují zvýšeného růstu oproti plodným rybám diploidním. U celé řady komerčních druhů se tržní triploidní ryby vyznačují malým či žádným vývojem pohlavních orgánů, kdy veškerá či většina přijaté energie je využívána k somatickému růstu. Takové triploidní ryby se proto mohou výhodněji (při lepší konverzi živin či s nižší agresivitou ryb) chovat do větších tržních velikostí (např. u pstruha duhového či lososa obecného) a tím dosahovat na trhu vyšší prodejní ceny z jednoho kilogramu prodávaných ryb. Finálně vyprodukované triploidní ryby mají podstatně nižší hmotnosti pohlavních gonád, které mohou např. u okounovitých ryb tvořit až 20 – 25 % hmotnosti těla. Tím se u těchto tržních ryb dosahuje daleko vyšší výtěžnosti masa při zpracování. Tržní lososovité ryby pocházejících z triploidních populací také dosahují lepší organoleptické kvality masa (např.: vybarvení svaloviny, vyššího obsahu tuku, nižšího obsahu vody v mase) oproti diploidním rybám. Totální či částečná sterilita triploidních ryb v chovech také způsobuje snížení sexuálního a teritoriálního chování ryb, které vede k výskytu nižšího stresu způsobeného agresivním chováním, poranění chovaných ryb a k nižší spotřebě energie. Tím dochází v chovech také k všeobecně vyššímu využívání (lepší konverzi) krmiv (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013; Rougeot, 2015; Stabińska a kol., 2016). Tento efekt je také očekáván u okounovitých triploidních ryb a v současné době je vědecky testován.

Triploidní jedinci se také produkují u druhů ryb, které jsou významné pro sportovní rybolov nebo pro svůj biomeliorační potenciál, s cílem zajistit jejich stoprocentní sterilitu při vysazování do volných vod mimo jejich přirozený areál rozšíření. Je totiž velmi důležité zabránit následnému rozmnožování a vytváření životaschopných populací těchto vysazených nepůvodních druhů. Takto produkování a využívání jsou triploidi amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) v USA a na Novém Zélandě pro spásání přemnožených vodních makrofyt, sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) na pacifickém pobřeží Severní Ameriky pro účely sportovního rybolovu či amura černého (*Mylopharyngodon piceus*) v Izraeli pro redukci přemnožených měkkýšů ve vodárenských nádržích, jak uvádí Flajšhans a kol. (2013).

Z výše uvedených důvodů je proto velmi vhodné začít více využívat triploidní ryby v produkčních akvakulturních provozech. Důvodem je především efektivnější a rentabilnější produkce tržních ryb. Komerční produkce a využití triploidních tržních jedinců totiž může vykazovat významně vyšší ekonomické zhodnocení nejen při vlastním chovu, ale také při zpracování, či vysazování do volných vod mimo jejich domovinu (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

V současné době se nejčastěji komerční produkce triploidů využívá u následujících druhů: pstruh duhový (v USA, Kanadě, Francii, Japonsku, Velké Británii, Jižní Korei, Íránu, Turecku, Polsku a Chile), pstruh obecný – *Salmo trutta* (ve Velké Británii a Francii), siven americký (v Kanadě a Francii), losos obecný (v Norsku, Kanadě a Chile), siven arktický neboli severní – *Salvelinus alpinus* (ve Francii, Kanadě, na Islandu a v Rakousku), další druhy lososů (v Kanadě a Japonsku) a amur bílý (v USA) (Arai, 2001; Hulata, 2001; Rothbard, 2006; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

Dále se využití triploidů experimentálně testovalo či testuje, popřípadě i sporadicky v praxi využívá u následujících druhů: kapr obecný – *Cyprinus carpio* (Linhart a kol., 1991), lín obecný (Flajšhans a kol., 2007; 2010), sumec velký (Linhart a kol., 2001), z jeseterů např. u j. krátkorýpého – *Acipenser brevirostrum* (Beyea a kol., 2005) nebo j. sibiřského – *A. baerii* (Fopp-Bayat a kol., 2006).

4 Metody využívané ke stanovení ploidní úrovně u ryb

Aby chovatelé měli jistotu, že opravdu díky využívaným fyzikálním šokům získávají a následně mohou odchovávat populace triploidních ryb, je důležité ovládat metody, které lze využít k efektivnímu stanovení ploidní úrovně u produkovaných ryb. Následně ze zjištěného počtu diploidních, triploidních či jiných ploidních úrovní ryb lze výpočtem zjistit podíl triploidních (polyploidních) ryb v dané populaci (Rougeot a Mélard, 2008a). Samozřejmě cílem je k dalšímu chovu získávat stoprocentní, tedy čisté triploidní populace. Ovšem velmi často u některých druhů ryb není dosahováno čisté triploidní populace, kdy triploidi tvoří jen třeba 70 – 90 % ryb v populaci, nebo je dosahováno nízkého podílu vylíhlých kvalitních larev bez morfologických deformit. K ověření podílu triploidních ryb v dané populaci po indukci triploidie a po vylíhnutí larev slouží níže uvedené metody (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

4.1 Přímé metody

Metody, které přímo zjišťují ploidní úroveň u ryb, jsou založené na principu stanovení karyotypu, kvantifikují obarvená jádérka v buňkách či kvantifikují obsah DNA ve specificky barvených buněčných jádrech pomocí průtokové cytometrie, spektrofluorometrie a mikrodenzitometrie (Rougeot a Mélard, 2008a; Flajšhans a kol., 2013).

4.1.1 Stanovení karyotypu

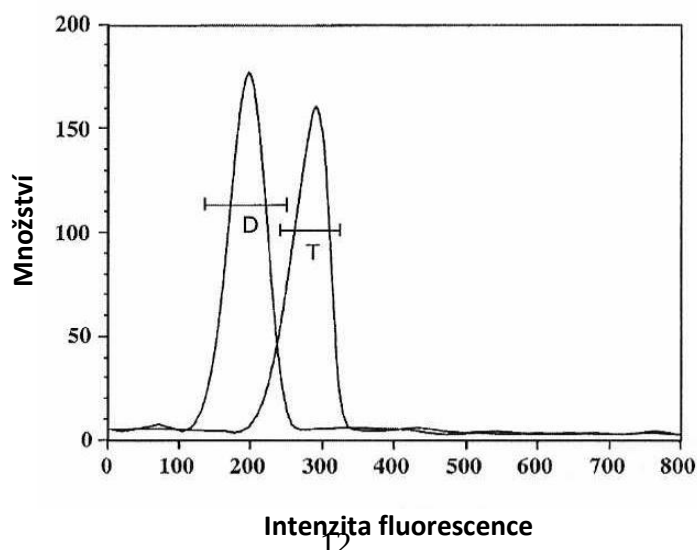
Tato přesná, ale pomalá a pracná metoda je založena na preparaci chromozómů z metafázní buňky a sledování počtu chromozómů pomocí optického mikroskopu a mikrofotografie. V dnešní době se využívá především mikroskopické digitální zobrazení a počítačová analýza obrazu. Metoda je založena na nutnosti preparace, fixace a následného barvení chromozómů. Mezi nejpoužívanější postupy, jak chromozómy získat, patří přímá preparace chromozómů juvenilní či dospělé ryby po jejím usmrcení a hypotonizaci buněk odebraných z kraniální části ledvin, sleziny, gonád či epiteliálních buněk žaber. Jinou metodou je sterilní odběr krve či ploutevního lemu, kultivace leukocytů či fibroblastů *in vitro*, s následnou hypotonizací a preparací chromozómů. Vyšetření jedné ryby touto metodou, kterou je nutno oproti jiným uváděným metodám odchovat do poměrně vysokého věku, může zabrat až 1 den. Tato metoda proto nemá praktické využití v poloprovozních testech či v produkčních podmínkách. Jedná se ale o základní laboratorní referenční metodu (Rougeot a Méléard, 2008a; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

4.1.2 Kvantifikace obarvených jadérek v buňkách

Jedná se o velmi rychlou a levnou metodu, která ovšem může být využita jen pro obarvení organizovaných oblastí jadérek (tzv. NOR – Nucleolar Organizer Region) nebo celých jadérek v metafázních či interfázních buňkách. Dalším omezením této metody je, že se může bezpečně využít jen u ryb, které mají v haploidní sadě chromozómů jen jeden chromozóm s NOR. V praxi je pak komplikací skutečnost, že celá řada rybích druhů má vyšší nebo nižší počet chromozómů s NOR v haploidní sadě, než následně odpovídá jejich skutečné ploidii. Z uvedených důvodů je tato metoda obtížně použitelná u většiny hospodářsky významných druhů ryb, kdy cílem je spolehlivě stanovit jejich ploidní úroveň (Rougeot a Méléard, 2008a; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

4.1.3 Kvantifikace obsahu DNA v buněčných jádrech

Tato metoda je založena na permeabilizaci buněčné membrány a obarvení jaderné DNA některým DNA specifickým barvivem. Po obarvení DNA se pomocí průtokové cytometrie nebo spektrofluorometrie měří intenzita fluorescence, která je emitovaná obarvenou DNA. Výsledkem analýz jsou histogramy, které graficky znázorňují intenzitu fluorescence potažmo množství DNA v jádrech. Triploidní ryby mají 3 sady chromozómů a tedy přibližně 1,5 krát více DNA než ryby diploidní (Obr. 7; Ewing a kol., 1991; Flajšhans a kol., 2013).



Obr. 7. Histogram zobrazující intenzitu fluorescence potažmo obsah DNA diploidů a triploidů u embryí okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.) 6 dní po oplození (převzato z Rougeot a kol., 2013).

Tato metoda je relativně rychlá, lze při ní vyšetřit až 20 ryb za hodinu a je vhodná pro praktické použití v poloprovozních či komerčních podmínkách (Rougeot a Méléard, 2008a). Určitou nevýhodou průtokové cytometrie je skutečnost, že ke stanovení intenzity fluorescence, potažmo množství DNA, je nutné vlastnit nezbytné laboratorní vybavení a chemikálie, a také především poměrně finančně nákladný průtokový cytometr (Obr. 8). I přesto je tato metoda v praxi nejvíce využívána, jelikož umožňuje rychle a relativně snadno ověřit a vyhodnotit produkci triploidních ryb z čerstvě vylíhnutých či zafixovaných larev. Není nutné tedy ryby odchovávat do větších velikostí a vyššího věku (Ewing a kol., 1991; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).



Obr. 8. Jednakanálový průtokový cytometr Partec CCA I (Foto: M. Růžek).

4.2 Nepřímé metody

Nepřímé metody stanovující úroveň ploidie u ryb jsou založeny na: měření velikosti buněk, buněčných jader pomocí klasických hematologických postupů, Coulterově metodě stanovující objem buněk pomocí impedance, měření buněčných či jaderných geometrických charakteristik pomocí mikroskopu a mikrofotografie či analýzy obrazu nebo na základě měření morfologických rozdílů určitých specifických znaků mezi chovanými diploidními, triploidními či polyploidními rybami (Flajšhans a kol., 2013). Obecně tyto nepřímé metody vyžadují odchov ryb do vyššího věku a velikosti umožňující odběr krve nebo projev pohlavního dimorfismu. To je samozřejmě časově i finančně náročnější. Dnes se již ke zjišťování ploidní úrovně ryb v rybářském výzkumu, při poloprovozních experimentech, ani v produkční rybářské praxi celosvětově nevyužívají nepřímé metody tolik, jako dříve. Některá pracoviště vybavená

přístroji na měření objemu buněk typu Coulter Counter je však i nadále používají ke stanovení ploidní úrovně se stejnou účinností jako průtokovou cytometrii (Fiske a kol., 2019).

5. Produkce a využití triploidů u okounovitých ryb

Indukce a využití triploidů u okounovitých ryb nebyla zatím v praxi našich a ani zahraničních rybářských podniků nijak významně uplatněna. Tento stav trvá i přesto, že existuje několik níže popsaných a ověřených technologických postupů, jak produkce triploidních okounovitých ryb dosáhnout a potenciálně tyto ryby využívat k vyšší efektivitě jejich chovu jak v rámci rybníční, tak i intenzivní akvakultury (Malison a kol., 1993; 2001; Rougeot a kol., 2003; Rougeot a Mélard, 2008a, b; Rougeot, 2015). Je pravdou, že vyšší potenciál ve využití triploidních okounovitých ryb, které jsou plně či částečně sterilní, je očekáván v rámci rybníčního chovu. V tomto chovu totiž dochází ke kolísání teploty vody a světelného režimu, což prodlužuje produkční interval (tržní ryby jsou produkovány po dosažení pohlavní dospělosti) a stimuluje pohlavní dozrávání ryb a vývoj jejich gonád. V takovýchto podmínkách mají diploidní okounovité ryby pomalejší růst na konci odchovu, horší konverzi krmiv, nižší přežití, výtěžnost a také kvalitu masa, která se výrazným způsobem mění v průběhu celého ročního období. U intenzivního chovu okounovitých ryb využití triploidních ryb přináší pravděpodobně jen výhodu z hlediska snížené agresivity, vyšší konverze živin a zajištění vyššího přežití a vyšší kvality svaloviny u tržních ryb (Rougeot, 2015). Důvodem je fakt, že intenzivní chov okounovitých ryb využívající stabilní teplotu vody s optimem od 22 – 25°C už sám o sobě způsobuje částečnou spontánní sterilitu chovaných ryb (Rougeot, 2015; Policar a kol., 2016, 2019). Intenzivní chov okounovitých ryb je díky této skutečnosti výrazně zvýhodněn oproti chovu ve venkovních podmínkách (v rybnících, při kombinaci rybníčního a intenzivního chovu či klecovém chovu).

5.1 Produkce a využití triploidních ryb u okouna říčního a okouna žlutého

Jak už bylo zmíněno výše, triploidi okouna říčního se vyznačují částečnou či plnou sterilitou. Tržní ryby získané z triploidních populací v rámci různých systémů využívajících venkovní chov (vlastní rybníční chov, kombinace rybníčního a intenzivního chovu v uspořádání rybník-intenzivní akvakultura-rybník, dělený rybník na chov ryb a úpravu vody či klecový chov ryb v rybnících či jiných vodních nádržích poskytují vyšší efektivitu chovu. Vyšší efektivita produkce tržních ryb okouna říčního je zajištěna rychlejším růstem starších věkových kategorií ryb v konečné fázi chovu, lepší konverzí živin, vyšší výtěžností a vyšší kvalitou masa. Při využití ryb v intenzivní akvakultuře může docházet k nižší agresivitě mezi chovanými rybami, vyššímu přežití, vyšší konverzi živin a vyšší kvalitě svaloviny u tržních ryb. V tomto chovu nedochází u triploidních ryb okouna říčního k vyššímu somatickému růstu oproti rybám diploidním (Rougeot a Mélard, 2008a, b; Rougeot, 2015).

Indukcí triploidie pomocí teplého šoku se u okouna říčního zabývali Rougeot a kol. (2013). Zmínění autoři doporučují k produkci triploidů okouna říčního používat jako nejefektivnější variantu teplého šoku následující ošetření: **teplota vody při šoku 30°C, zahájení šoku 5 – 7 minut po oplození** při teplotě vody 16 – 17 °C **a délka šoku 25 minut**. Zmíněné ošetření poskytuje **triploidní populaci ryb z 93 – 100 % a výtěžnost triploidů** z počtu použitých oplozených jiker se pohybuje **na úrovni 43 – 44 %**. Detailní informace o efektivitě všech testovaných variant teplého šoku sumarizuje Tab. 2. V této tabulce jsou ještě tučně s kurzívou uvedeny další efektivní varianty šoků, které by mohly být v praxi potenciálně také využity pro produkci triploidních populací okouna říčního. Tyto varianty ošetření totiž také zajišťují akceptovatelnou míru produkce triploidů u okouna říčního (Rougeot a kol., 2003).

Tab. 2. Jednotlivé varianty ošetření při teplém šoku při indukci triploidie u okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.)(převzato z Rougeot a kol., 2003). Tučně jsou zvýrazněny nejvyšší hodnoty týkající se podílu nebo výtěžnosti triploidů v získané populaci.

Zahájení šoku (min. po oplození)	Teplota vody (°C)	Délka šoku (min.)	Přežití embryí (%)*	Podíl triploidů (%)	Výtěžnost triploidů (%)
3	34	2	39±12	7±3	3±2
		5	11±2	55±17	6±3
	35	2	37±7	7±3	3±1
		5	3±3	14±14	1±1
	36	2	14±7	44±16	8±6
		5	0	0	0
5	28	10	37±19	37±8	14±9
		25	26±8	44±7	12±5
	30	10	36±3	88±6	30±2
		25	43±34	100	43±34
	34	2	37±13	0	0
		5	7±3	24±15	2±1
	35	2	24±9	43±12	9±2
		5	0	0	0
	36	2	31±18	55±9	20±14
		5	0	0	0
7	28	10	62±25	38±2	24±11
		25	46±34	62±12	32±26
	30	10	38±7	98±2	37±6
		25	47±17	93±0	44±16

* Přežití embryí 6. den po oplození jiker

U příbuzného **okouna žlutého** (*Perca flavescens*), který pochází ze Severní Ameriky, je nejeefektivnějším způsobem indukce triploidie **teplý šok** (při **28 – 29°C**) **se začátkem šoku 5 minut po oplození jiker** při teplotě vody 11 °C **s délkou trvání šoku 10 – 25 minut**. Takovéto ošetření zajišťuje **přežití embryí** ve stáří 6 – 7 dnů po oplození na úrovni **46,7 – 63,3 %** a **podíl triploidů** v získané populaci na úrovni **66,7 – 100 %**. **Výtěžnost triploidních ryb** je tedy potom na úrovni **42,2 – 53,3 %**. Vedle teplého šoku je u okouna žlutého také možné využít **tlakového šoku** na úrovni **62,05 – 75,84 MPa** se **zahájením šoku 5 minut po oplození jiker** při teplotě vody 11 °C, s **délkou šoku 12 minut**. Takovéto ošetření oplozených jiker zajišťuje **přežití embryí** na úrovni **63,3 – 80 %** a **podíl triploidů** na úrovni **50 – 54,4 %**. Tím je tedy dosažena **výtěžnost triploidů** na úrovni **31,7 – 43,5 %** (Malison a kol., 1993a). U juvenilních triploidních ryb okouna žlutého, které jsou získávány zmíněným teplým či tlakovým šokem, byla zjištěna snížená rychlost růstu do hmotnosti 25 gramů, která je pravděpodobně způsobena aplikovaným šokem po oplození jiker. Dále bylo zjištěno, že zmínění juvenilní triploidi mají retardovaný vývoj gamet oproti diploidním jedincům. Rychlost růstu triploidních ryb však dohání v průběhu odchovu postupně růst diploidních ryb. Aby se zabránilo negativnímu vlivu indukce triploidie na počáteční růst žlutého okouna, je doporučeno v podmínkách Severní Ameriky k produkci

triploidů zmíněného druhu používat křížení mezi tetraploidními a diploidními jedinci (Malison a kol., 1993b; Malison a Garcia-Abiado, 1996).

5.2 Produkce a využití triploidních ryb u candáta obecného a severoamerických druhů candátů

Potencionální komerční využití, význam a výhody využití triploidních ryb candáta obecného v rámci produkčního rybářství či při uplatňování ryb na trhu je velmi podobné jako u okouna říčního. Výzkum zabývající se optimalizací indukce triploidie u candáta obecného je v Evropě na samém počátku a pouze autorský tým z FROV JU publikoval či připravuje k publikování zatím první vědecké výsledky týkající se tohoto vědeckého tématu (Blecha a kol., 2016; 2019).

Tento výzkum byl především inspirován optimalizací indukce triploidů u severoamerických druhů candátů jako je candát severoamerický - *Sander vitreus* (synonymum *Stizostedion vitreum*) a mezidruhový hybrid vzniklý křížením *Sander vitreus* (samice) x candát kanadský - *Sander canadensis* (synonymum *Stizostedion canadense* - samec). U těchto druhů bylo úspěšně k indukci triploidie použito následujících fyzikálních šoků (Garcia-Abiado a kol., 2001; Malison a kol., 2001).

U *Sander vitreus* je pro produkci triploidů možno využít jako nejefektivnější šokové ošetření **tlakový šok** na úrovni **48,26 – 55,16 MPa**, se **začátkem 4 minuty po oplození jiker** při teplotě vody 11°C a **délkou šoku 15 – 30 minut**. Takováto kombinace šoku zajistila **přežití embryí** ve stáří 6 – 7 dnů po oplození jiker na úrovni **56,7 – 88,3 %**, s **podílem triploidů** na úrovni **72,2 – 100 %**, tzn., s **výtěžností triploidů** na úrovni **40,9 – 63,3 %**. U stejného druhu byl také použit i **teplý šok** při teplotě vody 30°C, **začátku šoku 2 – 5 minut po oplození jiker** při teplotě vody 11°C a s **délkou šoku 25 minut**, který zajistil **přežití embryí** na úrovni **13,3 – 16,7 %**, s **podílem triploidů 30,3 – 44,3 %**. Avšak tento typ šoku zajistil **celkovou výtěžnost triploidů** jen na úrovni **kolem 5 %** (Malison a kol., 2001).

U severoamerického mezidruhového hybrida candáta pocházejícího z křížení *Sander vitreus* x *Sander canadensis* je možné s úspěchem použít následující fyzikální ošetření oplozených jiker, které poskytují poměrně efektivní produkci (výtěžnost) triploidní ryb:

a) teplý šok s teplotou vody 31°C, který je zahájený **5 minut po oplození jiker** při teplotě vody 10 – 11°C, s **délkou aplikace 15 – 25 minut**, kdy je dosaženo **podílu triploidů** na úrovni **79,8 %**, s **přežitím embryí v očních bodech 52,2 %** a **celkové výtěžnosti triploidů** na úrovni **41,7 %**,

b) chladový šok s teplotou vody **1,2 ± 0,7 °C**, který je zahájený **5 minut po oplození jiker** při teplotě vody 10 – 11°C, s **délkou aplikace 120 – 180 minut**, kdy je dosaženo **podílu triploidů** na úrovni **30,8 %**, s **přežitím embryí v očních bodech 24,6 %** a **celkové výtěžnosti triploidů** kolem **7,5 %**,

c) tlakový šok s vyvinutým a udržovaným tlakem na úrovni **62,05 MPa**, který je zahájený **4 minuty po oplození jiker** při teplotě vody 10 – 11°C, s **délkou šoku 12 minut**, kdy je dosaženo **podílu triploidů** na úrovni **100 %**, s **přežitím embryí v očních bodech 29,2 %** a **celkové výtěžnosti triploidů 29,2 %** (Garcia-Abiado a kol., 2001).

V současné době jsou u candáta obecného otestovány první varianty teplého a chladového šoku. Avšak stále se hledá varianta šokového ošetření, která by zajistila vyšší efektivitu triploidizace v podobě vyšší líhivosti triploidních larev a celkově vyšší výtěžnosti triploidních candátů pro další chov. Veškeré výsledky z prozatím realizovaného teplého a chladového šoku v rámci triploidizace candáta obecného sumarizuje Tab. 3 a 4. Ze zmíněných realizovaných experimentů vyplývá, že prozatím nejúspěšnější ošetření pro indukci triploidie u candáta obecného představuje realizovaný **chladový šok** při **teplotě vody 1 – 1,1 °C**, který byl **zahájený 5 minut po aktivaci gamet** při teplotě vody 14,8 °C, a **trval 120 minut**. Výsledkem tohoto

ošetření bylo **dosažení 100 % triploidní populace**, avšak **s nízkou líhivostí larev (17,3 %)** a celkovou **výtěžností triploidů** na úrovni **17,3 %**. U teplého šoku při indukci triploidie candáta obecného vykazovaly nejlepší výsledky v podobě **podílu triploidů na úrovni 13,2 – 53,3 %** a **celkové výtěžnosti triploidů na úrovni 10,7 – 13,2%** varianty šoku, které využily **teplotu vody 31°C se zahájením šoku 3-10 minut po oplození jiker** při teplotě vody 15,2 °C a **délkou šoku 20 – 40 minut**.

Obecně všechny zmíněné varianty při testované indukci triploidie candáta obecného dosáhly velmi nízké líhivosti larev a nízké výtěžnosti triploidů v získané populaci. Z tohoto důvodu pro další optimalizaci triploidizace candáta obecného je nutné testovat nové proměnné faktory jednotlivých šoků. Pro další experimenty jsou jako vhodná indukce triploidizace u candáta obecného vytipovány následující šoky:

- teplý šok na úrovni 24 – 28°C, s délkou šoku 5 – 25 minut, nebo 32 – 34°C, s délkou šoku 30 sekund až 3 minut se zahájením šoku 2 – 7 minut po oplození jiker,
- chladový šok s teplotou vody 1-1,5°C, s délkou šoku od 90 do 180 minut a začátkem šoku 3 – 5 minut po oplození jiker,
- tlakový šok na úrovni 45 – 75 MPa, s délkou 5 – 30 minut a začátkem šoku 2 – 7 minut po oplození jiker.

Tab. 3. Výsledky triploidizace u candáta obecného (Sander lucioperca L.) pomocí teplého šoku (Blecha a kol., 2016). Tučně jsou zvýrazněny nejvyšší hodnoty týkající se podílu nebo výtěžnosti triploidů v získané populaci.

Intenzita šoku (°C)	Zahájení šoku po aktivaci gamet (min.)	Délka šoku (min.)	Líhivost (%)	Podíl triploidů (%)	Výtěžnost triploidů (%)
29	1	20	0	-	-
		40	0	-	-
	3	20	1,3	11,0	0,1
		40	0	-	-
	5	20	3,1	33,3	1,0
		40	0	-	-
	7	20	8,0	16,6	1,3
		40	0	-	-
	10	20	11,5	25,3	2,9
		40	1,3	75,0	1,0
31	1	20	2,3	100	2,3
		40	3,1	100	3,1
	3	20	11,8	95,8	11,3
		40	7,1	91,0	6,5
	5	20	7,8	100	7,8
		40	8,5	88,8	7,6
	7	20	15,3	86,3	13,2
		40	13,2	90,0	11,9
	10	20	20,0	53,3	10,7
		40	18,3	41,8	7,7

Tab. 4. Výsledky triploidizace u candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) pomocí chladového šoku (Blecha a kol., odesláno do redakce). Tučně jsou zvýrazněny nejvyšší hodnoty týkající se podílu nebo výtěžnosti triploidů v získané populaci.

Intenzita šoku (°C)	Zahájení šoku po aktivaci gamet (min.)	Délka šoku (min.)	Líhivost (%)	Podíl triploidů (%)	Výtěžnost triploidů (%)
1,0 -1,1	5	20	23,2	9,5	2,2
		40	14,0	19,5	2,7
		60	5,6	80,5	4,5
		90	6,4	100	6,4
		120	17,3	100	17,3
	7	20	20,0	19,1	3,8
		40	10,6	42,9	4,6
		60	8,8	33,3	2,9
		90	6,7	75,0	5,0
		120	2,6	100	2,6
	10	20	13,4	57,1	7,7
		40	9,6	61,9	5,9
		60	10,2	37,7	3,8
		90	6,2	76,6	4,8
		120	3,7	90,2	3,3
	15	20	18,8	26,6	5,0
		40	12,2	38,0	4,6
		60	7,7	12,6	1,0
		90	7,8	65,7	5,1
		120	8,2	61,0	5,0
	20	20	23,6	0	–
		40	17,5	0	–
		60	18,2	0	–
		90	7,8	0	–
		120	0	-	–

5.3 Závěrečné shrnutí nejúspěšnějších variant fyzikálních šoků pro indukci triploidie u okounovitých ryb

Na závěr této publikace jsou v Tab. 5 shrnuty nejefektivnější fyzikální šoky testované či využívané pro indukci triploidie u okounovitých ryb v Evropě a Severní Americe. Z předložené tabulky vyplývá, že u všech okounovitých ryb je možné dosáhnout alespoň pomocí jedné varianty šoku stoprocentní triploidní populace. Efektivita triploidizace v podobě celkové výtěžnosti triploidů u jednotlivých triploidních ryb kolísá od nejvyšší hodnoty (kolem 53 – 63 %) u okouna žlutého a candáta severoamerického, přes střední úroveň (kolem 30 – 44 %) u okouna říčního a mezidruhového hybridu obou amerických candátů *Sander vitreus* x *Sander canadensis* až po nejnižší výtěžnost, která je prozatím dosahována u candáta obecného na úrovni 11 – 17%.

Tab. 5. Závěrečné shrnutí nejúspěšnějších variant fyzikálních šoků testovaných či využívaných při indukci triploidie u okounovitých ryb v Evropě a Severní Americe.

Druh ryby	Typ šoku	Zahájení šoku po aktivaci gamet (min.)	Intenzita šoku	Délka šoku (min.)	Podíl a výtěžnost triploidů (%)	Reference
Okoun říční	Teplý	5–7	30 °C	25	93–100/43–44	Rougeot a kol. (2003)
Okoun žlutý	Teplý	5	28–29 °C	10–25	67–100/42–53	Malison a kol. (2003a)
	Tlakový	5	62–76 MPa	12	50 – 54/32–44	
Candát severoamerický	Tlakový	4	48–55 MPa	15–30	72–100/41–63	Malison a kol. (2001)
Hybrid <i>S. vitreus</i> x <i>S. canadensis</i>	Teplý	5	31 °C	15–25	80/42	Garcia-Abiado a kol. (2001)
	Tlakový	4	62 MPa	12	100/29	
Candát obecný	Chladový	5	1–1,1 °C	120	100/17,3	Blecha a kol. (2019)
	Teplý	3–10	31 °C	20–40	13–53/11–13	Blecha a kol. (2016)

6. Srovnání „novosti postupů“

Cílem certifikované metodiky bylo souhrnně popsat efektivní metody vedoucí k indukci triploidie u okounovitých ryb s cílem potenciálně zefektivnit tuto produkci triploidních ryb a následně ji využít v rybářské praxi ČR, popřípadě Evropy. Publikace tohoto typu, která přímo popisuje triploidizaci u okounovitých ryb nebyla v ČR doposud ještě zveřejněna.

7. Popis uplatnění certifikované metodiky

Tato certifikovaná metodika je především určena k zavedení a následné optimalizaci produkce a využití triploidních ryb u okouna říčního v rybářských podnicích ČR. Dalším cílem této metodiky je také dále optimalizovat produkci triploidů u candáta obecného v ČR. Výsledky certifikované metodiky budou uplatněny v praxi rybářského produkčního podniku Rybářství Nové Hradky s.r.o. s cílem zefektivnit a zvýšit místní rybniční chov okouna říčního a candáta obecného.

8. Ekonomické aspekty

V ČR se každoročně vyprodukuje 20 tun tržního okouna říčního s tržní cenou 80 – 150 Kč za 1 kg živé ryby a 40 tun tržního candáta obecného s tržní cenou 270 – 350 Kč za 1 kg živé ryby. Okoun a candát v průměru v celé ČR každoročně tvoří celkové tržby na úrovni 14 – 15 milionů Kč. V případě, že by se v ČR začaly produkovat a využívat triploidní jedinci k rybničnímu chovu, mohlo by dojít k zvýšení růstu zmíněných okounovitých ryb o 5 – 10%. Tímto způsobem by tak mohlo dojít k zvýšení roční produkce obou druhů a to o cca 2 tuny u okouna a 4 tuny u candáta. Nárůst produkce by tak zvýšil roční tržby produkčním rybářským podnikům o zhruba 1,5 milionu Kč. Vedle těchto zvýšených tržeb by zpracovatelské podniky zvýšily výtěžnost

svaloviny z tržních triploidních ryb okouna a candáta o 15 – 20%. Při průměrné obchodní ceně filety z okouna či candáta na úrovni 500 – 750 Kč za kg a roční spotřebě filet zmíněných okounovitých ryb v ČR na úrovni 1 – 2 tun, by tak zavedení triploidů mohlo zpracovatelskému průmyslu v ČR přinést další zvýšené tržby na úrovni až 300 000 Kč ročně.

9. Seznam literatury

- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek B., Rulík, M., 2008. Aplikovaná hydrobiologie. VÚRH JU Vodňany, 256 s.
- Aegerter, S., Jalabert, B., 2004. Effects of post ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 231: 59–71.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of Aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197: 205–228.
- Beyea, M. M., Benfey, T. J., Kieffer, J.D., 2005. Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish Physiology and Biochemistry* 31: 303–313.
- Blecha, M., Malinovskyi, O., Flajšhans, M., Lebeda, I., Křišťan, J., Dadras, H., Policar, T., 2019. Triploidisation in pikeperch (*Sander lucioperca*) induced by cold shock. *Aquaculture*, odesláno do redakce.
- Blecha, M., Flajshans, M., Lebeda, I., Kristan, J., Svacina, P., Policar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. *Aquaculture* 462: 115–117.
- Dil, H., 2008. The European market of the pikeperch for human consumption. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N. (Eds), *Percid Fish Culture - From Research to Production*, Proceeding of abstracts and short communications of the workshop, Namur, Belgium, pp. 15–16.
- Drauch Schreier, A., Gille, D., Mahardja, B., May, B., 2011. Neutral markers confirm the octoploid origin and reveal spontaneous autopolyploidy in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Journal of Applied Ichthyology* 27: 24–33.
- Ewing, R.R., Scalet, C.G., Evenson, D.P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. *The Progressive Fish-Culturist* 53: 177–180.
- Flajšhans, M., Kohlmann, K., Ráb, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to post - ovulatory ageing *in vitro* and/or *in vivo*. *Journal of Fish Biology* 71: 868–876.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 2013. Polyploidie a genomové manipulace u ryb. In: Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., (Eds), *Genetika a šlechtění ryb*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2. vydání, s. 151-195.
- Flajšhans, M., Rodina, M., Kašpar, V., Luhan, R., 2010. Technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného (*Tinca tinca*) v provozních podmínkách rybích líhní. *Edice Metodik (technologická řada)*, VÚRH JU, Vodňany, č. 106, 19 s.
- Fopp-Bayat, D., Jankun, M., Woznicki, P., 2006. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt. *Caryologia* 59: 319-321,
- Friske, J.A., Van Eenennaam, J.P., Todgham, A.E., Young, S.P., Holem-Bell, C.E., Goodbla, A.M., Schreier, A.D., 2019. A comparison of methods for determining ploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture* 507: 435–442.

- Glover, K.A., Madhun, A.S., Dahle, G., Sørvik, A.G.E., Wennevik, V., Skaala, Ø., Morton C.H., Hansen, T.J., Fjellidal, P.G., 2015. The frequency of spontaneous triploidy in farmed Atlantic salmon produced in Norway during the period 2007–2014. *BMC Genetics* 16: 37.
- Havelka, M., Hulák, M., Ráb, P., Rábová, M., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Rodina, M., Gela, D., Pšenička, M., Bytyutskyy, D., Flajšhans, M., 2014. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *BMC Genetics* 15: 5.
- Havelka, M., Hulák, M., Rodina, M., Flajšhans, M., 2013. First evidence of autotriploidization in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Applied Genetics* 54: 201–207.
- Hladík, M., 2015. Principy hospodaření na rybářských revírech. In: Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J., Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., Just, T., Blabolil, Říha, M. (Eds), *Rybářství ve volných vodách*. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany, s. 160–171.
- Hulata, G., 2001. genetic manipulation in Aquaculture: a Review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155–173.
- Linhart, O., Flajšhans, M., Kvasnička, P., 1991. Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): A comparison of two methods. *Aquatic Living Resources* 4: 139–145.
- Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. *Journal of Applied Ichthyology* 17: 247–255.
- Malinovskyi, O., Veselý, L., Blecha M., Křišťan, J., Policar T., 2018. The substrate selection and spawning behavior of pikeperch *Sander lucioperca* L. broodstock under pond conditions. *Aquaculture Research* 49: 3541–3547.
- Malison, J.A., Garcia-Abiado, A.R., 1996. Sex control and ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*). *Journal of Applied Ichthyology* 12: 189–194.
- Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.P., Amundson, Ch., 1993a. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation. *Aquaculture* 110: 229–242.
- Malison, J.A., Procarione, L., Held, J.A., Kayes, T.B., Amundson, Ch., 1993b. The influence of triploidy and heat hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 116: 121–133.
- Malison, J.A., Held, J.A., Weil, L.S., Kayes, T.B., Thorgaard, G.H., 2001. Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock. *North American Journal of Aquaculture* 63:17–24.
- Olin, M., Vainikka, A., Roikonen, T., Ruuhijarvi, J., Huuskonen, H., Kotakorpi, M., Vesala, S., Ala-Opas, P., Tiainen, J., Nurminen, L., Lehtonen, H., 2018. Trait-related variation in the reproductive characteristics of female pikeperch (*Sander lucioperca*). *Fisheries Management and Ecology*. 25: 220–232.
- Overton, J.L., Toner, D., Policar, T., Kucharczyk, D., 2015. Chapter 35: Commercial production: factors for success and limitations in European percoid fish culture. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes—Principles and Practices*. Springer, New York, USA, pp. 881–890.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125–156.

- Policar, T., Stejskal, V., Kristan, J., Podhorec, P., Svinger, V., Blaha, M., 2013. The effect of fish size and density on the weaning success in pond-cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles. *Aquaculture International* 21: 869–882.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Malinovskyi, O., Vaniš, J., 2017. Může být kombinace rybníčního a intenzivního chovu candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) úspěšně využita v rámci českého produkčního rybářství? In: Urbánek, M. (Ed), 4. ročník odborné konference Rybářské sdružení České republiky. Sborník referátů z odborné konference, České Budějovice 9.–10. února 2017, s. 33–41.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Mráz, J., Velíšek, J., Stará, A., Stejskal, V., Malinovskyi, O., Svačina, P., Samarin, A. M., 2016. Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles as a valuable product for on-growing culture. *Aquaculture International* 24: 1607–1626.
- Policar, T., Schaefer, F., Panana, E., Meyer, S., Teerlinck, S., Toner, D., Żarski, D., 2019a. Recent progress in European percoid fish culture production technology – Tackling bottlenecks. *Aquaculture International* 27: 1151–1174.
- Policar, T., Křišťan, J., Malinovskyi, O., Yanes-Roca, C., 2019b. Možnosti diverzifikace a posílení konkurenceschopnosti české akvakultury. In: Urbánek, M. (Ed), Sborník referátů 5. ročníku odborné konference, České Budějovice 14.-15.2.2019, s. 87–92.
- Rothbard, S., 2006. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58: 266–279.
- Rougeot, C., 2015. Chapter 23: Sex and ploidy manipulation in percoid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percoid Fishes—Principles and Practices*. Springer, New York, USA, pp. 625–634.
- Rougeot, C., Mélard, C., 2008a. Genetic improvement of growth. In: Rougeot, C., Toner, D., (Eds) *Farming of Eurasian Perch*, Special publication BIM 24, Dublin, Ireland, pp. 42–51.
- Rougeot, C., Mélard, C., 2008b. Genetic improvement of growth in perch production: domestication, sex control, hybridization and strain selection. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N., (Eds): *Percoid Fish Culture - From Research to Production*. Proceeding of abstracts and short communications of the workshop, Namur, Belgium, pp. 35–39.
- Rougeot, C., Minet, L., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P-P., Melard, C., 2003. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 16:90–94.
- Samarin, A. M., Blecha, M., Bytyutskyy, D., Policar, T., 2015. Post-ovulatory oocyte ageing in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 15: 435–441.
- Samarin, A. M., Blecha, M., Uzhytchak, M., Bytyutskyy, D., Zarski, D., Flajshans, M., Policar, T., 2016. Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Aquaculture* 450: 431–438.
- Schwinger, V., Seyfried, R., Kallert, D., Fjellidal, P.G., Baierl, F., Lebeda, I., Speierl, T., Täubert, J-E., Flajshans, M., 2018. Späte Laichreife und spontane Triploidie bei Saiblingen – hängt natürliche Aneuploidie mit Fehlentwicklungen und Absterben der Embryos zusammen? *Fischer und Teichwirt* 69, 1: 5–8.
- Slavík, O., 2015. Vysazování ryb a regulace rybolovu. In: Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J.,

- Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., Just, T., Blabolil, Říha, M. (Eds), *Rybářství ve volných vodách*. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany, s. 156–159.
- Stabińska, A., Król, J., Stabiński, R., Hliwa, P., 2016. Triploidization of percid fishes- a change for improvement and diversification of European Aquaculture? *Polish Journal of Natural Sciences* 31: 707–718.
- Toner, D., 2015. Chapter 34: The market for Eurasian perch. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices*, Springer New York, New York, USA, pp. 865–879.
- Varkonyi, E., Bercsenyi, M., Ozouf-Costaz, C., Billard, R., 1998. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte aging in *Silurus glanis*. *Journal of Fish Biology* 52: 899–906.

10. Seznam literatury, která předcházela metodice

- Blecha, M., Flajshans, M., Lebeda, I., Kristan, J., Svacina, P., Policar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. *Aquaculture* 462: 115–117.
- Buchtová, H., Vorlová, L., Svobodová, Z., Flajšhans, M., 2005. Chemical composition of flesh of diploid and triploid population of tench (*Tinca tinca*, Linnaeus 1758). *Czech Journal of Animal Science* 50: 213–219.
- Bytyutskyy, D., Flajšhans, M., 2014. Use of diploid and triploid tench (*Tinca tinca*) blood as standards for genome size measurements. *Journal of Applied Ichthyology* 30 Suppl. 1: 12–14.
- Bytyutskyy, D., Kholodnyy, V., Flajšhans, M., 2014. 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish. *Cell Biology International* 38: 708–715.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Mavrodiev, N., Nebesářová, J., Gela, D., Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International* 14: 9–25.
- Flajšhans, M., Kohlmann, K., Ráb, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to post - ovulatory ageing *in vitro* and/or *in vivo*. *Journal of Fish Biology* 71: 868–876.
- Flajšhans, M., Rodina, M., Kašpar, V., Luhan, R., 2010. Technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného (*Tinca tinca*) v provozních podmínkách rybích líhní. Edice Metodik (Technologická řada), VÚRH JU, Vodňany, č. 106, 19 s.
- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 317–329.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 305 s.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užité vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2012. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách. Edice Metodik (Technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 121, 21 s.

- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2012. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) v provozních podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 139, 17 s.
- Havelka, M., Hulák, M., Ráb, P., Rábová, M., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Rodina, M., Gela, D., Pšenička, M., Bytyutskyy, D., Flajšhans, M., 2014. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. BMC Genetics 15: 5
- Havelka, M., Hulák, M., Rodina, M., Flajšhans, M., 2013. First evidence of autotriploidization in sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Genetics 54 (2): 201–207
- Piačková, V., Flajšhans, M., 2006. Long-term examination of health conditions in monoculture of communally tested amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture International 14: 43–59.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture 293: 125–156.
- Policar, T., Stejskal, V., Bláha, M., Alavi, S.M.H., Kouřil, J., 2009a. Technologie intenzivního chovu okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 89, 51 s.
- Policar, T., Křišťan, J., Blecha, M., Vaniš, J., 2014. Adaptace a chov juvenilních ryb candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému (RAS). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 141, 46 s.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Svačina, P., 2015a. Metody a postupy využívané v intenzivní akvakultuře. In: Velíšek, J., Kouba, A., Dvořáková, Z. (Eds): Potenciál recirkulačních akvakulturních systémů (RAS) pro české produkční rybářství. Sborník příspěvků z odborného semináře, Vodňany 1.–2. září 2015, s. 62–77.
- Policar, T., Samarin, A. M., Melard, Ch., 2015b. Chapter 16: Culture methods of Eurasian perch during ongrowing. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds): Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices, Springer New York, New York, USA, pp. 417–435.
- Schwinger, V., Seyfried, R., Kallert, D., Fjellidal, P.G., Baierl, F., Lebeda, I., Speierl, T., Täubert, J.-E., Flajšhans, M., 2018. Späte Laichreife und spontane Triploidie bei Saiblingen – hängt natürliche Aneuploidie mit Fehlentwicklungen und Absterben der Embryos zusammen? Fischer und Teichwirt 69, 1: 5–8.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů č. **QK1710310** s názvem „Využití nových biotechnologických postupů v podmínkách české akvakultury s cílem dosáhnout efektivní, kvalitní a ekologicky šetrné produkce ryb“ – 70 %, dále MŠMT projekty CENAKVA č. LM2018099 – 15 % a Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370 – 15 %.

Externí odborný oponent

Prof. Ing. Petr Ráb, DrSc., dr. h. c., Laboratoř genetiky ryb, Ústav živočišné genetiky a fyziologie AV ČR, v. v. i., Rumburská 89, 277 21 Liběchov

Interní odborný oponent

doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Oponent za státní správu

Ing. Lukáš Mareš, Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. vydalo Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství
Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

Adresa autorského kolektivu

prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. – 10 % Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

MSc. Hadiseh Dadras Asyabar, Ph.D. – 5 % Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Ing. Jiří Kříšťan, Ph.D. – 10 % Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D. – 75 % Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz; přidělený editor: ; redakce: ; náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2019; vytištěna v roce 2019; grafický design a technická realizace:.