

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

UMĚLÝ VÝTĚR LÍNA OBECNÉHO S VYUŽITÍM ENZYMU PŘI ODLEPKOVÁNÍ JIKER



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ VE VODŇANECH
Oddělení genetiky a šlechtění ryb se šlechtitelskou stanicí

O. LINHART, D. GELA, M. FLAJŠHANS, M. RODINA

UMĚLÝ VÝTĚR LÍNA OBECNÉHO S VYUŽITÍM ENZYMU
PŘI ODLEPKOVÁNÍ JIKER

č. 63

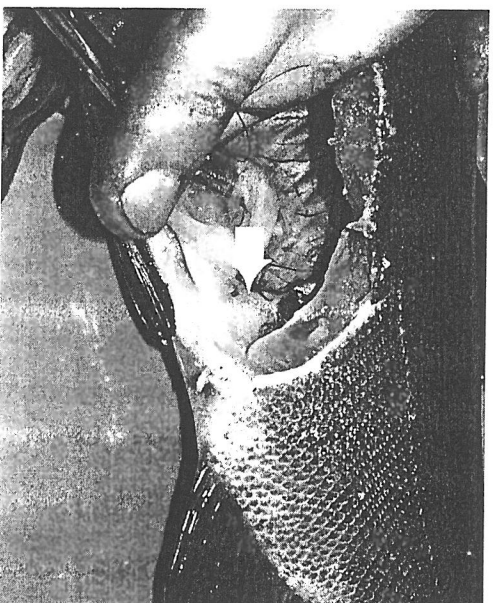
Vodňany

2000

ISBN 80 – 85887 – 33 - 9

1. Úvod

V posledním období byl umělý výter lina obecného včetně spermatogeneze, ovogeneze a reprodukčních ukazatelů popsán Linhartem a Billardem (1995a), detailní popis umělého výteru jikernáček podal Kouřil (1998) a výteru mlíčáků Linhart a kol. (1995). Poslední ucelená metodika umělého výteru lina obecného byla napsána Pokorným a Kouřilem (1983). Od vydání této metodiky došlo k významným změnám v přístupu k výběru generčních ryb, např. objevem dědičnosti barev u lina obecného, vytazováním sterilních/substerilních triploidních jedinců na základě morfologie břišních ploutví (Flajšhans a kol., 1993; Kvasnička a Flajšhans, 1993), a zejména ke změně metod při výteru použitím analógu GnRH „Kobarelin“ při umělém výteru jikernáček (Kouřil a kol., 1986, 1997) a použitím imobilizačního roztoku k inaktivaci pohybu spermií aktivovaných močí (Linhart a Kvasnička, 1992). Předpokládáme, že spermie jsou běžně u všech mlíčáků při výteru spermatu ředěny močí, která je shromažďována v močovém měchýři v místě vyústění pohlavního otvoru (obr. 1, Linhart a kol., 2000b). Další skutečnost, vedoucí k inovaci metodiky, je používání enzymu k odlepkování jiker po jejich aktivaci podle Linharta a kol. (2000b) a rovněž uplatnění modifikovaného přístroje „Dněpr“. Rybníkářství Hluboká a.s. pro rozplavání váčekového plůdku. Všechny tyto skutečnosti nás vedly k vydání této metodiky.



Obr. 1: Močový měchýř lina obecného (snímek O. Linhart)

Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J., 2000b. Ionic composition of seminal fluid and urine, and characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). (abstr.). In: III Int. Workshop on Biology and Culture of the Tench, Berlin, Germany.

Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Rodina, M., 2000c. Využití enzymu při odlepkování jiker u lina obecného. In: J. Mikešová (Ed). Sborník z ichthyologické konference, VÚRH JU Vodňany, v tisku.

Žuromska, H., 1981. Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench (*Tinca tinca* L.). Part VI. Estimation of milt quality. Pol. Arch. Hydrobiol., 28(2): 229-241.

Poděkování

Výzkumné práce, na jejichž základě vznikla tato metodika, byly umožněny autorům díky projektu Ministerstva zemědělství ČR, N-AZV č. EP0960996051 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, č. CEZ.J06/98:126100001.

Lektorovali:

Ing. Ludek Štěch, Alcedor s. r. o., Haškova 6, 370 01 České Budějovice

Adresy autorů:

Ing. Otomar Linhart, DrSc, Ing. David Gela, Ing. Martin Flajšhans a Ing. Marek Rodina, 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 : linhart@vurh.jcu.cz

V edici metodik vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech – Náklad: 200 ks – Tisk: Tiskárna Public – M. Kreuz, 389 01 Vodňany

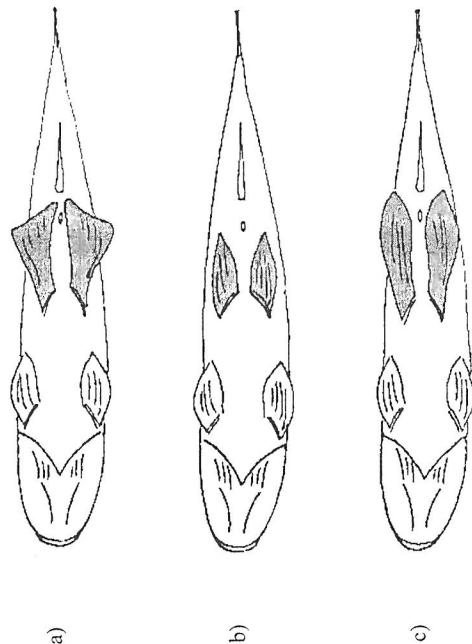
13. Literatura

- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.): high incidence of spontaneous triploidy. *Aquaculture*, 110: 243-248.
- Horváth, L., Tamás, G., Seagrave, C., 1992. *Carp and Pond Fish Culture*. Oxford, Fishing News Books, 157 pp.
- Chábera, V., 1980. Vyhodnocení umělého výtěru lina obecného (*Tinca tinca* L.) - plodnost jikmaček. Diplomová práce, České Budějovice, Zemědělská fakulta, 80 s.
- Kálal, L., Pružina, I., Tezner, J., 1986. Odběr ovcytů biopsií. Reprodukce a genetika ryb – sborník referátů z vědecké konference, Vodňany, s. 188-190.
- Kvasnička, P., Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (*Pisces: Tinca tinca* L.). *Journal of Heredity*, 89(6): 553-556.
- Kouřil, J., 1998. Hormonally induced spawning of tench *Tinca tinca* (L.) females. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 45, pp. 415-433.
- Kouřil, J., Barth, T., Hamáček, J., 1986. Indukovaný výtěr jikmaček lina pomocí analogů LH-RH. Vodňany, VÚRH, edice Metodik, č. 20, 4 s.
- Kouřil, J., Hamáček, J., 1992. Citlivost jiker kapra obecného, lina obecného a sumečka afrického ke koupelím v roztocích malachitové zeleně a Wescodyne v průběhu inkubace. In: Sborník z vědecké konference Reprodukce ryb 92; Vodňany, s. 137-141.
- Kouřil, J., Hamáček, J., Barth, T., 1997. Hormonální indukce umělého výtěru jikmaček některých druhů ryb. Vodňany, VÚRH JU, edice Metodik, č. 54, 6 s.
- Kvasnička, P., Flajšhans, M., 1993. Metoda morfologické identifikace triploidů v remontních hejnech lina. Vodňany, VÚRH, edice Metodik, č. 42, 8 s.
- Kubů, F., Kouřil, J., 1985. *Lin obecný*. Praha, ČRS, 100 s.
- Pekář, Č., 1965. Observation of the course of the spawning of tench (*Tinca tinca* L.). *Bul. VÚR Vodňany*, 1(2): 14-18.
- Pokorný, J., Kouřil, J., 1983. Intenzivní chov lina. Vodňany, VÚRH, edice Metodik, č. 5, 12 s.
- Linhart, O., Kouřil, J., Hamáček, J., 1986. The motile spermatozoa of wels (*Silurus glanis* L.) and tench (*Tinca tinca* L.) after sperm collection without water activation. *Práce VÚRH Vodňany*, 15: 28-41.
- Linhart, O., Kvasnička, P., 1992. Artificial insemination of tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, 23, pp. 125-130.
- Linhart, O., Peter, R.E., Rothbard, S., Zohar, Y., Kvasnička, P., 1995. Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH Analogues and injection of carp pituitary extract. *Aquaculture*, 129: 119-121.
- Linhart, O., and Billard, R., 1995a. Biology of gametes and artificial reproduction in common tench (*Tinca tinca* L.). A review. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 42(1-2): 37-56.
- Linhart, O., Billard, R., 1995b. Survival of ovulated oocytes and ova in the European catfish (*Silurus glanis* L.) after *in vivo* and *in vitro* storage or exposure to various solutions. *Aquatic Living Resources*, 8, pp. 317-322.
- Linhart, O., 1996. Umělé osemnění u sumce velkého, lina obecného a bolena dravého. In: M. Flajšhans (Ed) *Sborník vědeckých prací k 75. výročí založení VÚRH; Vodňany, VÚRH JU*, s. 42-46.
- Linhart, O., Walford, J., Sivaloganathan, B., Lam, T.J., 1999. Stripped and testicular sperm of fresh and seawater tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.*, 55, pp. 1344-1358.
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina, M., Novák, V., 2000a. Enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*, v tisku.

2. Příprava a výběr generačních ryb

Rybničky, ve kterých jsou komorovány generační ryby, lovíme v průběhu měsíce dubna. Obsádek v době manipulace zajistíme vhodné podmínky (co nejkratší doba manipulace, přechovávání v průtočných nádržích, šetrné zacházení s rybami, atd.) Generační hejno jednotlivě selektujeme na minimálně čtyři základní skupiny:

- jikmačky vhodné k výtěru
- mlíčačky vhodné k výtěru
- negativně selektované ryby, které opět vysadíme zpět do chovného rybníka
- negativně selektované ryby, které jsou zcela vyřazeny z dalšího chovu (tzn. starič, nemocné, poškozené a triploidní – tzn. neplodné ryby, viz obr. 2).

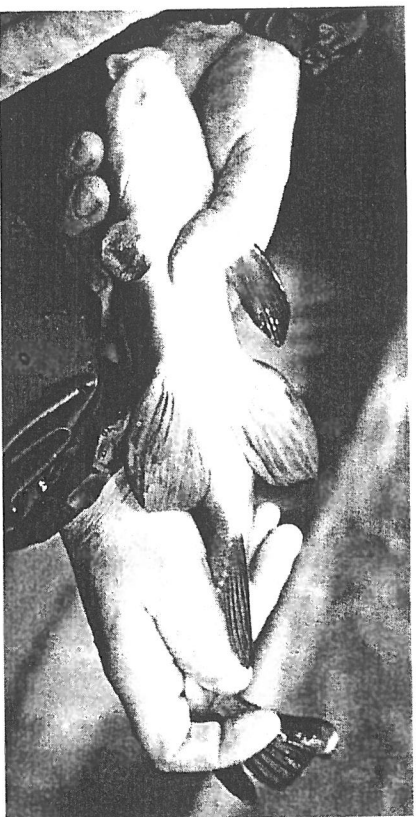


Obr. 2: Znázornění rozdílu tvaru a velikosti břišních ploutví diploidního mlíčka a), diploidní jikmačky b), triploidního jedince c) (podle Flajšhans a kol., 1993)

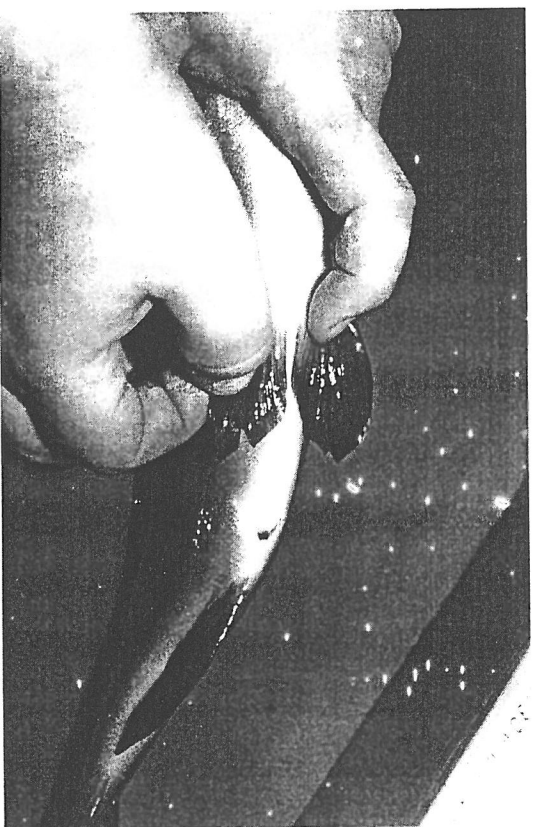
Při výběru ryb k umělému výtěru doporučujeme zařadit trojnásobně větší počet mlíčků než jikmaček. Předjedeme tak případnému problému s nedostatkem spermiu.

Rozdělení ryb v předvýtěrovém období dle pohlaví je velmi důležité, zabráníme tím přirozenému výtěru v manipulačních rybnících. Ryby sexujeme podle velikosti a tvaru břišních ploutví (obr. 2 - 5).

Rozdíl mezi triploidními a diploidními liny lze charakterizovat následovně: diploidní mlíčci mají větší břišní ploutve vějířovitého tvaru s tvrdším a mohutnějším prvním paprskem, které výrazně překrývají řitní otvor (obr. 2a, 3). Jikmačky mají menší, měkčí břišní ploutve, nepřekrývající řitní otvor (obr. 2b, 4). Triploidní mladších ročníků (L_2 , L_{2+}) mají měkčí břišní ploutve, vždy překrývající řitní otvor (obr. 2c). U triploidních ryb starších ročníků můžeme nalézt jedince s velmi podobnými ploutvemi, jako je tomu u diploidních mlíčků, ovšem s měkčím prvním paprskem a naopak též jedince, u nichž přetrvává samičí typ ploutví, vždy však překrývající řitní otvor (obr. 5).

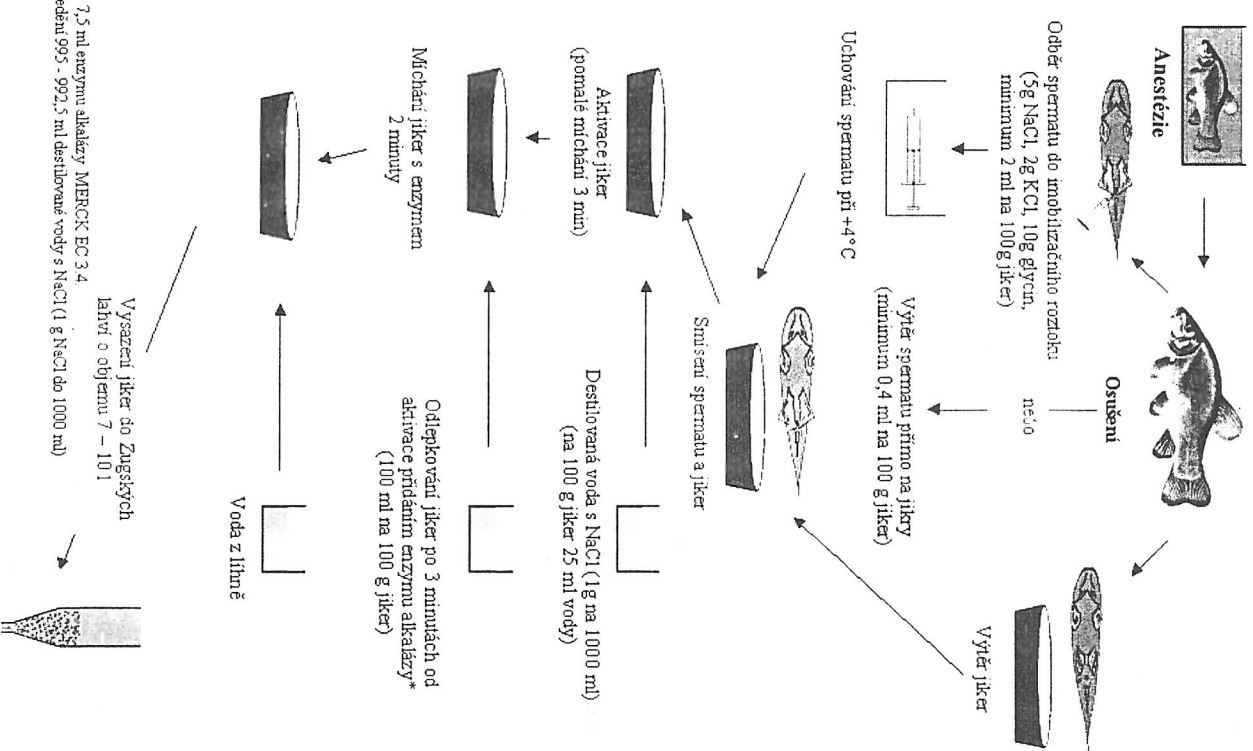


Obr. 3: Břišní ploutve diploidního miličáka (snímek M. Flajšhans)

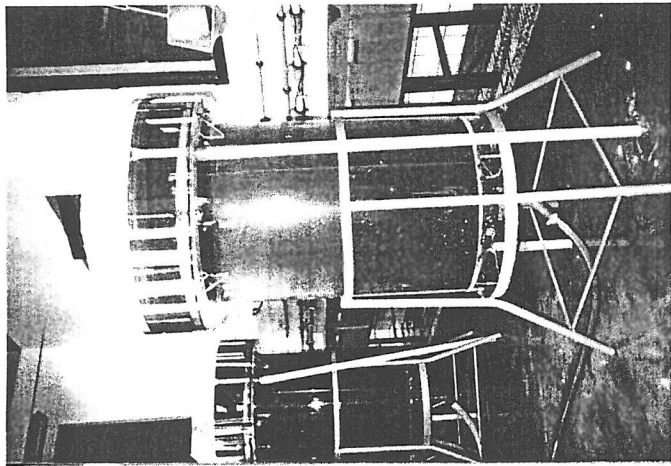


Obr. 4: Břišní ploutve diploidní jikernacky (snímek M. Flajšhans)

Jikernacky se k umělému výtěru používají ve věku 4 - 8 let o kusové hmotnosti 400 - 1 500 g, mličáci od 3 let při kusové hmotnosti 250 - 800 g. Jedince vybrané k umělému výtěru vysadíme do připravených manipulačních rybníků, ve kterých zabezpečíme rybám v předvýtěrovém období ty nejlepší podmínky (přirozená potrava, přikrmování kvalitními



Obr. 11: Schéma umělého osmenění a odlepkování jiker lina obecného (Linhart a kol., 2000c)



Obr. 10: Modifikovaný inkubátor Dněpr (snímek D. Gela)

obilovinami, naklíčeným obilím, krmnými směsmi KP-1, speciálními směsmi pro generační ryby). Krmivo se předkládá v závislosti na teplotě vody, velikosti obsádky a výskytu přirozené potravy. Průměrně se krmí dvakrát až třikrát v týdnu a denní dávka činí 1 - 3 % celkové hmotnosti ryb (Pokorný a Kouril, 1983). Pravidelně kontrolujeme teplotu vody, množství O_2 ve vodě a chemické vlastnosti vody. V případě dlouhodobě teplého počasí hrozí nebezpečí přirozeného výtěru, případně přezrávání jikernaček, proto zajišťujeme ochlazování vody v rybníčku zvýšeným průtokem.

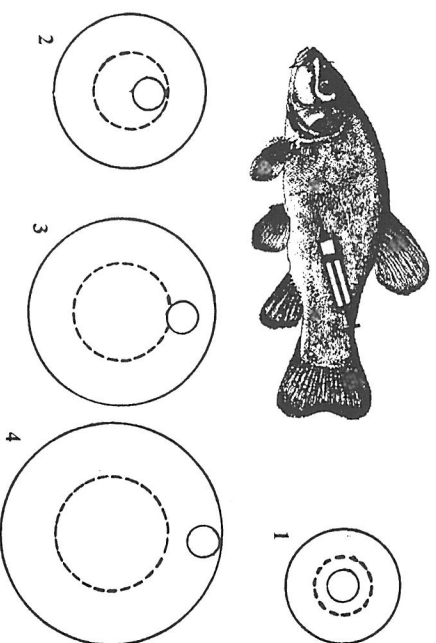


Obr. 5: Břišní ploutve triploidního lina (snímek M. Korwin-Kossakowski)

3. Posouzení připravenosti jikernaček k výtěru podle polohy jadra v ovocýtech po katetrizaci

V období před výtěrem je vhodné u několika kusů jikernaček posoudit jejich připravenost podle polohy jadra v ovocytu (Kálal a kol., 1986). Po celkové anestézii jikernačky se provede biopsie přes stěnu břišní odběr ovocytů do fyziologického roztoku (obr. 6). Používá se jehla o vnitřním průměru 2,5 mm, nasazená na 10-20 ml injekční stříkačku. Před odběrem nasajeme do injekční stříkačky 0,5 ml fyziologického roztoku (6,5 g NaCl do litru destilované vody). Jehlou opláchnutou v koncentrovaném alkoholu propícháme břišní stěnu dorzálně od kaudálního konce břišní ploutve ve výšce prsní ploutve a pod úhlem 30-40° ji zatlačíme asi 10-20 mm ve směru kranialním. Nasajeme 0,5 - 1,0 ml ovocytů, které po odejmutí jehly vytlačíme do zkumavky nebo jiné malé uzavíratelné nádoby o objemu 20 ml,

rozřežeme a přidáme asi pětinásobný objem prosvětlovacího roztoku (složení ve 100 ml: 60 ml koncentrovaného etanolu, 30 ml formaldehydu, 10 ml kyseliny octové). Po 5 minutách jsou jikry průhledné, jádro je zřetelné a můžeme posoudit polohu jader v oocytech. Místa vpichu ošetříme jikernáčkem roztokem manganistanu draselného (1:1 000). Prosvětlené jikry přeneseme na hodinové skíčko nebo do Petriho misky a pozorujeme polohu jádra pod stereolupou. Jikernáčky jsou připraveny k výtěru, pokud se poloha jádra nachází v postavení 3 (viz. obr. 6). V případě polohy jádra v postavení 2 je vhodné opakovat punkci zhruba po týdnu v závislosti na vývoji teplotních poměrů.



Obr. 6: Místo vpichu kaetru při biopsii a umístění jader v oocytech odebraných biopsií (modifikováno podle Kálaš a kol. 1986)

4. Výběr vhodných generačních ryb k výtěru a jejich nasazení do líhně

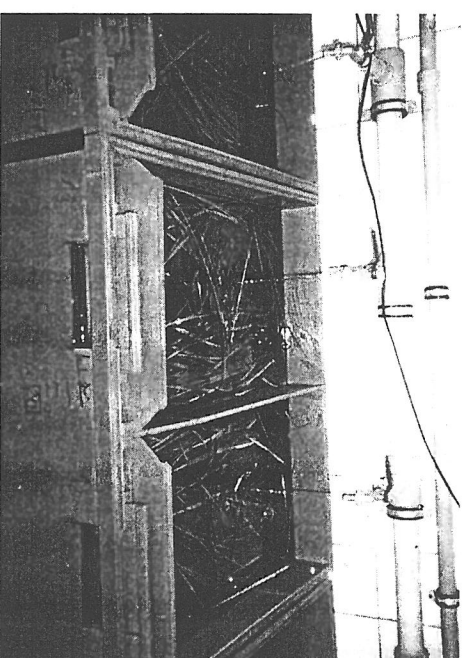
Období vrcholné předvýtěrové zralosti se podle místních klimatických podmínek dostává u generačních linií v průběhu měsíce června. Rybník lovíme podle možnosti 2 - 3 dny před plánovaným umělým výtěrem. Zásadně se musíme vyvarovat nebezpečí přidůsení a poškození ryb (dlouhý výšší teplotě vody se zvyšuje aktivita ryb). Stres ryb minimalizujeme při převozu v co nejvyšší míře kyslíkováním (na 2 000 l vody v přepravní bedně dáváme maximálně 80 - 100 kg ryb). Jikernáčky se po výlovu rozdělí podle připravenosti k výtěru (objemnost a měkčnost břišních partií) na dvě skupiny. Jikernáčky v optimální zralosti se převážou na líhni do připravených zlábků (50 kg na 1 000 l vody) s vodou vytěpovanou na teplotu v rybníce a zbylí jedinci se opět vysadí do připraveného rybníka pro pozdější výtěr. Dle počtu k výtěru připravených jikernáček nalovíme a do zlábků v líhni přemístíme trojnásobné množství mlíček (50 kg na 1 000 l vody).

12. Inkubace jiker a rozplavání plůdku

Oplozené a odlepkované jikry nasazujeme do inkubačních lahví pro kaprovité ryby (Zugské láhve) do max. dvou třetin objemu láhve. Po dostatečném propláchnutí jiker seřídíme průtok vody tak, aby jikry v láhvi jenně vířily, ale nebyly vyplavovány přes okraj láhve. V případě, že se jikry po nalití do láhve slepují k sobě nebo na stěny láhve, snížením hladiny vody v láhvi a kratším rychlým roztočením jiker tento problém odstraníme. Jikry se lepší především ze dvou důvodů:

- 1) špatně provedené odlepkování enzymem, tzn. nepřesná koncentrace roztoku, nedodržení dvouminutové doby odlepkování
- 2) nízká teplota vody v láhvi (optimum je 20 - 22,5 °C).

V průběhu inkubace jiker denně odstraňujeme uhnulé jikry a provádíme preventivní koupel jiker roztokem Wescodynu dvakrát denně v koncentraci 1-2 ml.l⁻¹ při teplotě vody 20 - 22 °C (Kouřil a Hamáčeková, 1992). Plůdek se kuli přibližně za 1260 h^o, tzn. zhruba o 5-10 h dříve než při odlepkování suspenzí mléka a jila (1350-1370 h^o). Vykuleny plůdek se přeploví nebo přenesou po odstranění zbytků obalů z jiker do kolíbek pro váčkový plůdek. V malých provozech je možné využít pevné kolíbků (obr. 9) o objemu např. 70 l s přítokem vody (0,2 - 0,4 l.min⁻¹) s nasazením do 100 tis. ks váčkové plůdku na kolíbků. Ve velkých provozech se osvědčil modifikovaný inkubátor Dněpr (Rybníkářství Hluboká a.s.), do kterého se nasazuje až 1 mil. ks váčkové plůdku (obr. 10). Plůdek se vysazuje do rybníků po rozplavání, tzn. 6 - 7 dnů od vykuknutí, při teplotě vody do 20 °C.



Obr. 9: Pevné kolíbků k odchovu vykuklého váčkové plůdku do jeho rozplavání (snímek D. Gela)

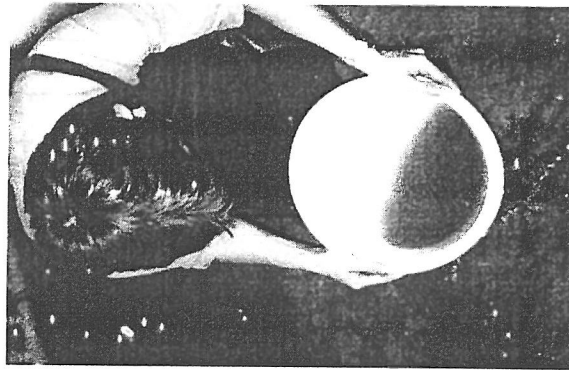
11. Umělé osemenění jiker, aktivace, odlepkování

V případě využití metody spermatu odebraného do imobilizačního roztoku se směs jiker od několika jikernaček osemení heterospermicky v dávce 2 ml heterospermatu v imobilizačním roztoku na každých 100 g jiker.

Druhý případ osemenění je proveden při přímém výtěru mlíčáků na jikry. viz. odstavec **Metoda přímého výtěru mlíčáků na jikry**.

Aktivace se provádí okamžitě po dokončení osemenění v objemu 20 - 25 ml destilované vody s rozpuštěným NaCl (1 g NaCl do 1000 ml destilované vody) na 100 g jiker. K aktivaci používáme vodu o teplotě 20 - 22 °C. Od okamžiku aktivace osemeněných jiker se měří čas! Po dobu aktivace opatrně mícháme jikry.

Po 3 minutách od aktivace gamet se provede odlepkování enzymem alkalázou (Alcalase, Merck EC 3.4.21.14.) podle metody Linhart a kol. (2000a) v objemu 5 - 7,5 ml enzymu do 995 - 992,5 ml vody s rozpuštěným NaCl (1 g NaCl na 1000 ml destilované vody) o teplotě 20 °C. Přidává se 100 ml roztoku enzymu na 100 g jiker, roztok se přilije do misky s jikrami, z nichž byla předem slita voda. Odlepkování se provádí opatrným mícháním jiker s enzymem po dobu 2 min. Těsně před ukončením odlepkování se enzym slije a přesně v druhé minutě od začátku odlepkování se jikry 3krát za sebou propláchnou čistou vodou z láhne o teplotě 20 °C (obr. 8) nebo v případě, že inkubační láhve nejsou napojeny na recirkulační okruh, se přímo nalijí do alespoň 3krát většího objemu vody v inkubační láhvi a velkým průtokem vody v láhvi se enzym odstraní. Celý postup znázorňuje obr. 11.



Obr. 8: Promývání odlepkovaných jiker před vysazením na láhve (snímek O. Linhart)

Přípravné žláby postupně temperujeme na optimální teplotu 21 °C se zajištěním dostatečného průtoku a množství O₂ ve vodě. Žláby je nutné zabezpečit proti poranění ryb. Při hormonální stimulaci umělého výtěru Kobarelinem jikernačky injikujeme okolo plůnoci při teplotě 21 °C. Zhruba po dvaceti hodinách se zvýší teplota vody na odtoku ze žláby na 23 °C. Ryby jsou následně připraveny k výtěru za dalších 5 - 10 hodin (25-30 hodin po injikaci), tj. v časných ranních hodinách, nejpozději dopoledne druhého dne. Po 22 hodinách (podle teploty vody) od injikace jikernaček je vhodné průběžně kontrolovat připravenost jikernaček k výtěru.

5. Hormonální stimulace generačních línů

Předem vybrané jikernačky lina se stimulují k výtěru jednorázovou vnitrosvalovou injekcí roztoku Kobarelinu [syntetického analogu (D-Ala⁶)LH-RH Pro NHEt] ve fyziologickém roztoku (Kouřil 1998) v dávce 5 µg·l⁻¹ živé hmotnosti ryby. Vyšší dávky Kobarelinu, tzn. 10 µg·kg⁻¹ živé hmotnosti ryby snižují úspěšnost výtěru a prodlužují dobu potřebnou od injikace do výtěru (Kvasnička, nepublikováno). Injekce se provádí obdobně jako u kapra, tj. ze strany pod hřbetní ploutev. K ovulaci dojde při teplotě vody 22 - 23 °C za 24 až 30 hodin.

Stimulace mlíčáků lina ke spermiaci se provádí jednorázovou vnitrosvalovou injekcí kapří hypofýzy, rozetřené a rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, v dávce 1,5 - 2,0 mg·kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Vyšší dávka hypofýzy (4 mg na kg živé hmotnosti) má rovněž kladný vliv na zvýšení objemu spermatu, dochází ovšem k poklesu koncentrace spermií a tím i k celkovému množství spermií ve srovnání s 1,5 mg hypofýzy na kg hmotnosti mlíčáka (Linhart a kol., 1995). Optimální doba k odběru spermatu je po 24 hodinách, případně po 48 hodinách působení hormonu při teplotě vody 21 - 22 °C (Linhart a kol., 1995). Vyšší úroveň spermiace lina obecného byla zjištěna po podání Kobarelinu, nicméně je nutné používat poměrně vysokou, a tím i drahou dávku na úrovni minimálně 20 µg·kg⁻¹ živé hmotnosti ryby.

6. Sperma lina obecného

Sperma lina obecného je konzistence a barvy mléčné, hustoty řidké až velmi řidké. Sperma lina je vždy naráženo močí. Moč se automaticky dostává do spermatu nebo naopak při masáži břišní partie a tím i masáží varlat a močového měchýře. Zjistili jsme přítomnost velmi malého močového měchýře s objemem moči od 0,5 do 2 ml u dospělých ryb v hmotnosti od 400 do 700 g (obr. 1) v oblasti vyústění chámovodů (Linhart a kol., 2000b). Odebraná tekutina z měchýře je čirá bez přítomnosti spermií s osmotickou koncentrací na úrovni od 82 do 123 mOsmol·kg⁻¹, přičemž testikulární sperma vykazuje osmolalitu na úrovni od 244 do 299 mOsmol·kg⁻¹ (Linhart a kol., 2000b). Podobnou osmotickou koncentraci vykazala moč u sumce velkého (Linhart a Billard, 1995b) nebo tilapie mozambičské (Linhart a kol., 1999). V čeledi kaprovitých je zřejmě lin prvním druhem, u kterého byl močový měchýř nalezen.

Sperma nedefinované moči má osmotickou koncentraci na úrovni 300 mOsmol·kg⁻¹ a je tedy logické, že spermie jsou močí aktivovány. Po dalším nařazení spermatu vodou představovala doba hromadného pohybu spermií 36 - 52 s, přičemž pohyb spermií skončil po 161 až 188 s. Žuromska (1981) posoudila postupný pohyb hromadný spermií jako

dlohodobější v rozmezí od 0 do 93 s. Objem spermatu se pohybuje na úrovni 0,7 - 0,8 ml s relativním objemem spermatu na kg hmotnosti mlíčka od 1,6 do 2,6 ml. Průměrná koncentrace spermií v ml spermatu se pohybuje na úrovni $11,23 \cdot 10^9$ - $24,35 \cdot 10^9$ s celkovým počtem spermií od $8,9$ do $20,77 \cdot 10^9$ a relativní počet spermií na 1 kg hmotnosti mlíčka činí od $18,50$ do $48,16 \cdot 10^9$ (Linhart a kol., 1986; Linhart a Kvasnička, 1992). Poněkud nižší hodnoty celkového počtu spermií $1,04 \cdot 10^9$ - $10,8 \cdot 10^9$ zjistila Žuromská (1981). Projeví se kladný vliv uchovávání ředěného spermatu v imobilizačním roztoku ve srovnání s nativním spermatem po 3 hodinách od uchovávání (Linhart a Kvasnička, 1992).

7. Anestézie před umělým výtěrem

Před umělým výtěrem nebo biopsií genitální ryby anestezizujeme vhodným přípravkem pro ryby (např. 2-phenoxyethanol, Merck, s dávkováním 1 – 3 ml anestetika na 10 l vody). V současné době jej dodává JU VÚRH Vodňany.

8. Příprava imobilizačního roztoku, odběr spermatu a krátkodobé uchování spermatu

Metoda odběru spermatu do imobilizačního roztoku

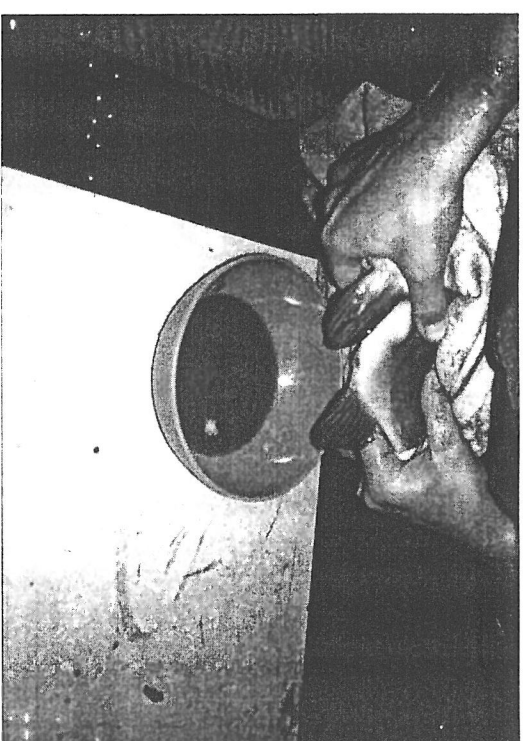
Vzhledem k velkému natečení spermatu lina moči nelze krátkodobě uchovávat sperma lina bez použití imobilizačního roztoku. U lina bylo použito speciálních imobilizačních roztoků (5 g NaCl, 2 g KCl a 10 g glycinu na litr destilované vody nebo 10,5 g NaCl, 2,4 g Tris-HCl, pH 7,0) v poměru jeden díl spermatu a dva díly imobilizačního roztoku (Linhart, 1996). Před odběrem spermatu plníme jednorázové 10 - 20 ml injekční stříkačky do poloviny objemu imobilizačním roztokem. Injekční stříkačky s roztokem můžeme do odběru spermatu uchovat při pokojové teplotě (cca. 20 °C). Při výtěru mlíčeků se snažíme rybu nejdříve zbavit moči masáží břišní partie od břišních ploutví směrem k ocasu. Moč je bezbarvá a při výtěru se uvolňuje proudem. Sperma bývá moči kontaminováno a přítomnost spermatu poznáme podle bělavého nebo opalizujícího zbarvení tekutiny. V tom případě již tekutinu odsáváme. Sperma vždy odsáváme do jednorázových plastových 10 - 20 ml injekčních stříkaček s přebytkem imobilizačního roztoku maximálně do poměru spermatu : imobilizačnímu roztoku 1 : 2. Ředěné sperma imobilizačním roztokem se uchovává v injekčních stříkačkách, nejlépe ovšem v uzavřeném kontejneru pro buněčné kultury uloženém v lednici nebo polystyrenovém kontejneru při +4 °C, tzv. na plocho s desetinasobkem objemu vzduchu pro zabezpečení dobré respirace spermií.

Před oplozením se dávky spermatu v imobilizačním roztoku od jednotlivých mlíčeků smísí v suché čisté odměrné nádobě a dále se pracuje s tzv. heterospermatem. Heterosperma na jikry dáváme velkoobjemovou mikropipetou, čistou injekční stříkačkou nebo klasickou pipetou.

Metoda přímého výtěru mlíčeků na jikry

Po osušení mlíčeků je sperma přímo vytíráno na jikry v misce od jedné nebo několika jikernaček (obr. 7). Po každém osemnění jsou jikry se spermatem promíchány. Promícháním

spermatu jiker (spermatu a ovariální plazmy) imobilizujeme pohyb spermií. Postupně vytíráme takové množství mlíčeků, až dosáhneme minimálně objemu 0,4 ml spermatu na 100 g jiker. Po osemnění provádíme okamžité aktivaci vodou z llně.



Obr. 7. Přímý výtěr mlíčka na jikry (snímek O. Linhart)

9. Plodnost lina obecného

Přirozený výtěr lina obecného probíhá obvykle v červnu až srpnu a vyznačuje se porcovým dozráváním a porcovým výtěrem jiker (Peňák, 1965). Plodnost jikernaček je vysoká na úrovni od 140 000 do 230 000 jiker-kg⁻¹ hmotnosti jikernaček (Chábera, 1980; Horvát a kol., 1992). Průměr suchých jiker je velmi variabilní od 0,4 do 1,0 mm (Kubů a Kouřil, 1985) s počtem jiker 1,8 – 2,2 mil. v 1 litru (Pokorný a Kouřil, 1983).

10. Výtěr jikernaček

Před výtěrem anestezovanou jikernačku osušíme. Jikry vytíráme do předem zvažených suchých misek a jikry se váží. Výtěr se musí provádět opatrně, aby se moč nebo výkalý nedostaly mezi jikry. Přepočtem (v 1 g jiker je cca. 1 600 kusů jiker) se zjišťuje plodnost jikernaček po výtěru. Údaje se zaznamenávají do výtěrových listů. Misky s jikrání se přikryjí čistou vlhkou utěrkou a umístí ve štinu na chladné podlaže llně. Tímto způsobem je možné zhruba do jedné hodiny po výtěru krátkodobě uchovávat jikry.