VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
JIHOČESKÉ UNIVERZITY
SE SÍDLEM VE VODŇANECH

UMĚLÝ VÝTĚR SUMCE VELKÉHO 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

Otomar Linhart, David Gela, Marek Rodina

UMĚLÝ VÝTĚR SUMCE VELKÉHO S VYUŽITÍM ENZYMU PŘI ODLEPKOVÁNÍ JIKER

č. 70

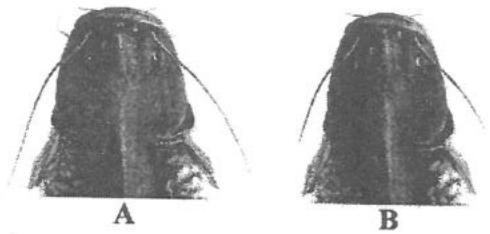
Vodňany

2001

ISBN 80-85887-40-1

1. Úvod

Sumcoviti včetně dvou druhů v Europě patří mezi významné Euroasijské sladkovodní druhy. Větší z obou druhů sumec velký (*Silurus glanis* L.) anglicky wels, sheat-fish, European catfish, charakteristický 6 vousy se nachází v celé Evropě. Menší druh, tzv. Aristetolův sumec anglicky Aristotle's catfish, [*Silurus (Parasilurus) aristotelis* A.] pouze se 4 vousy je endemický v západní části Řecka (Teugels, 1996) (obr. 1). Všichni ostatní sumcovití jsou soustředěni v centrální a jižní Asii.



Obr. 1: **A** - *Silurus glanis*, **B** - *Silurus (Parasilurus) aristotelis*

Sumec velký je předmětem chovu v Evropě více než 100 let (Linhart a Proteau, 1993). Chov v intenzivních akvakulturních termoregulovaných a rybničních systémech expandoval od roku 1990 do Bulharska, Francie, Maďarska, Chorvatska a České Republiky. Produkce sumce velkého v akvakulturních chovech představovala v deseti evropských zemích (Rakousko, Bulharsku, Chorvatsko, Česká republika, Francie, Maďarsko, Řecko, Makedonie, Polsko a Rumunsko) v roce 1993 úroveň 602 t (Proteau a kol., 1996) a v současnosti se blíží hranici 2000 t (Linhart a kol., 2002). Naopak celková produkce sumce velkého včetně lovu v řekách, jezerech a údolních nádrží se v Evropě včetně Azerbajdžánu, Gruzie, Kazachstanu, Tadžikistanu, Turkmenistanu a Uzbekistanu snížila z 17459 t v roce 1990 na 11286 t v roce 1999, a to díky nižšímu lovu sumce v deltě Volhy v bývalých zemích SSSR (FAO, 1999a,b).

V posledním období byl umělý výtěr sumce velkého včetně spermatogeneze, ovogeneze a reprodukčních ukazatelů popsán Legendrem a kol. (1996), popis umělého výtěru jikernaček podal Kouřil a kol. (1996), výtěru mlíčáků Linhart a Billard (1994), umělého osemenění Linhart (1997), Linhart a kol. (1997), kvality spermií Saad a Billard (1995), Billard a kol. (1997), Cosson a kol. (1997), kvality jiker Linhart a Billard (1995) a proces průniku spermie do jikry popsal Kudo a Linhart (1994). Poslední ucelená metodika umělého výtěru sumce velkého byla napsána Kouřilem a kol. (1992). Od vydání této metodiky došlo k významným změnám v přístupu k výtěru a to použitím analogu GnRH „Kobarelin", LHRH analogu s pimozidem nebo Ovopelem při umělém výtěru jikernaček (Kouřil a kol., 1987, 1996a; Brzuska a Adamek, 1999; Brzuska, 2001), použitím několikanásobné hypofyzace u mlíčáků dojde k lepší stimulaci spermiace (Linhart a kol. 1995) a optimalizaci inseminace a aktivace jiker včetně nového imobilizačního a aktivačního roztoku (Linhart, 1997; Linhart a kol., 1997). Další skutečnosti vedoucí k optimalizaci metodiky jsou množství krmných ryb při přípravě generačních ryb (Kouřil a kol., 1996b), používání enzymu k odlepkování jiker po jejich aktivaci podle Proteau a kol. (1994), Linharta (1997) a Linharta a kol. (1997), uplatnění individuálního značení mikročipovými značkami (Flajšhans a Daněk, 1994), prokázání rychlejšího růstu mlíčáků oproti jikrnačkám již v preadultním období (Haffray a kol., 1998), uplatnění triploidizace s testem růstu diploidního a triploidního plůdku (Linhart a Flajšhans,

Lektoroval:
Ing. Karel **Dubský**, Střední rybářská škola, 389 01 Vodňany

Adresy autorů:

Doc. ing. Otomar **Linhart**, DrSc, Ing. David **Gela**, 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

Linhart, O., Flajšhans, M., 1995. Triploidisation of European catfish (*Silurus glanis* L.) by heat shock. Aquac. Res., 26: 367-370.
Linhart, O., Billard, R., Proteau, J.P., 1993. Cryopreservation of European catfish (Silurus glanis L.) spermatozoa. Aquaculture, 115: 347-359.
Linhart, O., Prod'homme, M., Billard, R., Kouřil, J., Hamáčková, J., 1995. Extended spermiation by repeated injection with carp pituitary gland in the European catfish (*Silurus glanis* L.). In: Goetz, F.W., Thomas, P. (eds.). 5th Int. Symposium Reproductive Physiology of Fish, 126. Austin, University of Texas in Austin.
Linhart, O., 1997. Umělé osemeněni a revidovaný způsob umělého výtěru u sumce velkého, *Silurus glanis* L. Bul. VÚRH Vodňany, 33(3): 176-188.
Linhart, O., Billard, R., Kouřil, J. and Hamáčková J., 1997. Artificial insemination and gamete management in European catfish, *Silurus glanis* L. Pol.Arch.Hydrobiol., 44:9 – 23.
Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajšhans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. Journal of Appl. Ichtyol., 17: 247-255.
Linhart, O., Štěch, L., Švarc, J., Rodina, M., Audebert, J.P., Grecu, J., Billard, R., 2002. Present state of the culture of the European catfish (*Silurus glanis* L.) in Czech Republic and France. Aquat. Living Resour., v tisku.
Legendre, M., Linhart, O., Billard, R., 1996. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. Aquat.Living.Resour., 9: 59-80.
Orlova E. L., 1987. Peliculiarities of growth and maturation of the catfish, *Silurus glanis*, in the Volga delta under regulated flow conditions. Vopr. Ichtyol., 6: 945-955.
Proteau, J.P., Schlumberger, O., Albiges, C., 1994b. A new technique to remove the stickiness of European catfish, *Silurus glanis* eggs. In: Legendre, M., Proteau, J.P. (eds.). Int. Workshop on the Biological Bases for Aquaculture of Siluriformes. Montpellier, BASIL, p. 48.
Proteau, J.P., Hilge, V. and Linhart, O., 1996. État actuel et perspectives de la production aquacole des poissons-chats (Siluroidei) en Europe. Aquat.Living.Resour., 9: 229-235.
Saad, A., Billard, R., 1995. Production et gestion des spermatozoďdes chez le poisson-chat européen *Silurus glanis*. Aquat.Living Resour., 8: 323-328.
Shchishchabekov, M. M., 1978. Polovye cikly soma (*Silurus glanis* L.), shchuky (*Esox lucius* L.), okunya (*Perca fluviatilis* L.) i sudaka (*Lucioperca lucioperca* L.). Vopr.Ichtyol., 18(3): 507-518.
Steffens, W., Piesker, K., Reich B., 1994. Propagation of European catfish (*Silurus glanis*) in ponds. In: Legendre, M., Proteau, J. P. (eds.). Int. Workshop on the Biological Bases for Aquaculture of Siluriformes. Montpellier, BASIL, p.183.
Teugels, G. G., 1996. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Silurodei) an overview. Aquat. Living Resour. 9: 9-34.
Wisniewolski, W., 1988. Fecundity of catfish (*Silurus glanis* L.) from the rivers Vistula and Bug. Acta Ichtyol. Piscat., 18(1): 25-34.

1995; Linhart a kol., 2001) nebo zmrazování spermií (Linhart a kol., 1993) s vytvořením banky spermatu (Flajšhans a kol., 1998).

2. Příprava a výběr generačních ryb

V přípravě generačních ryb se ukázalo jako nejvhodnější umístění generačních ryb ve větších rybnících od léta do jara v biomase do 50 kg.ha^{-1} v polykultuře s matečným kaprem s dostatkem kvalitní potravy. Je nutné si uvědomit, že jikernačky v době jarního lovení se nacházeji ve IV. stupni zralosti, který podle Shchishchabekova (1978) byl identifikován již od září předchozího roku. Shchishchabekov (1978) zaznamenal největší růsty oocytů v období výtěru s II.- VI. stadiem zralosti, dále v období od výtěru do září s II. a III. stadiem zralosti a od září do jarního lovení s II.-IV. stádiem zralosti, tzn. před nástupem vitelogeneze. GSI hodnotil v srpnu na úrovni 0,8 až 1,3 %, v lednu 2,2 až 8,18 % a v dubnu 2,9 až 9,3 %. Obdobné výsledky získal v Polsku Wishnewolski (1988), v Čechách Hochman (1967) a na Volze v Rusku Orlova (1987). Proto jedním z rozhodujících období pro dobrý výsledek v reprodukci sumce velkého není jen období od dubna do června, tzn. před výtěrem v době vitelogeneze a hlavního růstu oocytů, jak je popisováno ve starší metodice Kouřilem a kol. (1992) nebo od září do dubna s formováním IV. stádia zralosti, ale rovněž období od posledního výtěru (tzn. července) do září v období formování oocytů se III. stupněm zralosti. Období formování co největšího počtu oocytů III. stupně zralosti, které v následujcím období mají přejít do hlavní oocytární růstové fáze, je pro budoucí výtěr zřejmě nejdůležitější. Podle výsledků Kouřila a kol. (1996b) období od dubna do výtěru v období druhé poloviny června není z hlediska výživy zřejmě rozhodující. Oproti dříve vydávaným doporučením o dvojnásobku (Kouřil a kol., 1992) nebo čtyřnásobku (Steffens a kol. 1994) množství krmných ryb, Kouřil a kol.(1996b) zjistil, že při nižší úrovni výživy a nižším přírustku bylo přesto dosaženo vyšší nebo stejné relativní plodnosti v době výtěru.

Rybníky, ve kterých jsou komorovány generační ryby, lovíme v průběhu měsíce dubna. Obsádce v době manipulace zajistíme vhodné podmínky (co nejkratší doba manipulace, přechovávání v průtočných nádržích, šetrné zacházení s rybou, atd.). Generační hejno individuálně mikročipy označených ryb jednotlivě selektujeme na minimálně 4 základní skupiny:

- jikernačky vhodné k výtěru vyznačující se dobrou kondicí a nasazením ovárií,
- mlíčáky vhodné k výtěru vyznačující se dobrou kondicí,
- negativně selektované ryby, které opět vysadíme zpět do chovného rybníka,
- negativně selektované ryby nadměrné velikosti nad 25 kg nepoužíváme k výtěru vzhledem špatné manipulaci při výtěru a velké spotřebě krmných ryb,
- negativně selektované ryby, které jsou zcela vyřazeny z dalšího chovu (tzn. staré, nemocné a poškozené).

Při výběru ryb k umělému výtěru doporučujeme zařadit 60 % mlíčáků a 40 % jikernaček. Předejdeme tak případnému problému s nedostatkem spermatu.

Rozdělení ryb v předvýtěrovém období dle pohlaví je velmi důležité, zabráníme tím přirozenému výtěru v manipulačních rybnících. Ryby sexujeme podle tvaru pohlavní papily a drsnosti prvních tvrdých paprsků prsních ploutví.

Jikernačka – pohlavní papila je oblá s větším a zarudlejším pohlavním otvorem. Tvrdý paprsek prsních ploutví má málo výrazný pilovitý okraj.

Mlíčák - pohlavní papila je štíhlejší, s menším ne tak výrazně zarudlým pohlavním otvorem. Tvrdý paprsek prsních ploutví má výraznější pilovité zakončení.

Pokud se jedná o skupinu sumců z jednoho chovu je pravděpodobné, že větší jedinci jsou mlíčáci a menší jikernačky. Mlíčáci rostou v průměru o 5-12 % rychleji než jikernačky.

Jikernačky se k umělému výtěru používají ve věku 4 – 10 let o kusové hmotnosti 5 – 25 kg a mlíčáci ve věku 5 - 12 let při kusové hmotnosti 7 – 25 kg. Jedince vybrané k umělému výtěru vysadíme do připravených manipulačních rybníků, ve kterých zabezpečíme rybám v předvýtěrovém období ty nejlepší podmínky (dostatek kyslíku a krmných ryb v poměru 1:2 – krmné ryby/sumci). Pravidelně kontrolujeme teplotu vody, množství O_2 ve vodě a chemické vlastnosti vody. V případě dlouhodobě teplého počasí hrozí nebezpečí spontánního výtěru, případně přezrání jikernaček, proto zajišťujeme ochlazování vody v rybníčku zvýšeným průtokem.

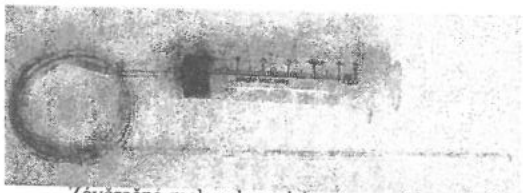
Rozhodující pro dobrý úspěch při výtěrech je vhodně odhadnout podle teplot daného roku a teplot loňského roku od července do října období připravenosti k výtěru. Pokud si nejsme jisti obdobím výtěru děláme odběr oocytů u 3 - 4 ks jikernaček alespoň 14-20 dnů před obvyklým datem výtěru. Před vlastním výtěrem vždy provádíme roztřídění jikernaček na základě velikosti oocytů a případného postavení jádra.

3. Odběr oocytů

V období před výtěrem je vhodné u několika kusů jikernaček posoudit jejich připravenost podle polohy jádra v oocytu. Po celkové anestezi jikernačky se provede odběr oocytů vejcovodem (obr. 3). Používají se plastové nebo skleněné pipety o vnitřním průměru 2,7 mm a vnějším průměru 3,2 mm nasazené na 20 ml injekční stříkačku (obr. 2). Před odběrem nasajeme do injekční stříkačky 2 ml fyziologického roztoku (9 g NaCl do litru destilované vody) a propláchneme jím kanylu s pipetou. Pipetu opláchnutou v koncentrovaném alkoholu a koncem namazaným v glycerínu opatrně zasouváme do vejcovodu. Při zavádění pipety opatrně rotujeme s pipetou v prstech a zasouváme ji do vzdálenosti 7 - 15 cm (podle velikosti ryb) od vývodu vejcovou. Po zavedení do pravého či levého ovária nasajeme 2,0 - 3,0 ml oocytů, které po vyjmutí trubičky udržujeme pro posouzení v trubičce. Po prvním posouzení proti světlu (posouzení velikostních skupin oocytů a stavu ovariální plasmy) vytlačíme obsah do zkumavky nebo jiné malé uzavíratelné nádoby o objemu 20 ml, přidáme asi pětinásobný objem prosvětlovacího roztoku a roztřepeme [složení ve 100 ml: 95 ml fyziologického roztoku (9 g NaCl/l destilované vody) a 5 ml koncentrované kyseliny octové, v žádném případě nepoužíváme Sérův roztok]. Po 5 minutách jsou jikry průhledné, jádro je zřetelné a můžeme posoudit polohu jader v oocytech. Prosvětlené jikry posuzujeme makroskopicky proti světlu.

Těsně po odběru oocytů (tzv. první posouzení) jsou viditelné dvě skupiny oocytů rozdělené do dvou velikostních skupin. Menší skupina oocytů do 0.5 mm je zastoupena v menší míře a tvoří zhruba do 5 % objemu oocytů, druhá skupina od 1,9 až 2,4 mm podle jikernaček představuje 95 % oocytů. Tato druhá skupina má být uniformní co do velikosti, tzn. v rozmezí 2,0-2,1 nebo 2,2-2,3 podle jikernaček.

Dále při prvním posouzení odhadujeme přítomnost rozpadlých oocytů v ovariální plasmě.



Obr. 2: Pipeta na odběr oocytů (foto M. Rodina)

Závěrečné makroskopické posouzení je na řadě po prosvětlení jiker, kdy odhadujeme polohu jádra v oocytu nebo jeho přítomnost. Rozeznáváme centrální pozici (tzv. poloha 1),

Literatura

Billard, R., Linhart, O., Fierville, F., Cosson, J., 1997. Motility of *Silurus glanis* spermatozoa in the testis and in the milt. Pol.Arch.Hydrobiol., 44: 115-122.

Brzuska, E., 2001. Artificial spawning of European catfish (*Silurus glanis* L.): differences between propagation results after stimulation of ovulation with carp pituitary and Ovopel. Aquaculture Research, 32: 11-19.

Brzuska, E., Adamek, J., 1999. Artificial spawning of European catfish, (*Silurus glanis* L.): stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. Aquaculture Research, 30: 59-64.

Cosson, J., Billard, R., Cibert, Ch., Dreanno, C., Linhart, O. and Suquet, M., 1997. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. Pol.Arch.Hydrobiol., 44: 103-113.

Hochman L., 1967. Fertility in the sheatfish (*Silurus glanis*). Acta Univ. Agric. Fac. Agron. 15(2): 333-335.

FAO, 1999a. FAO yearbook. Fishery statistics. Capture production. FAO, Rome, vol. 88/1, p. 156.

FAO, 1999b. FAO yearbook. Fishery statistics. Aquaculture production. FAO, Rome, vol. 88/2, p. 68.

Flajšhans, M., Daněk, O., 1994: Použití systému P.I.T. Tagging a programu GENOA verze 1.0 ke značkování a operativní evidenci sumce velkého (*Silurus glanis*) ve šlechtitelském programu. Bulletin VÚRH, 30,(4):128 - 133

Flajšhans, M., Linhart, O., Šlechtová, V., Šlechta V., 1999. Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic. Present state and future strategy. Aquaculture,173: 471-483.

Haffray, P., Vauchez, C., Vandeputte, M., Linhart, O., 1998. Different growth and processing traits in males and females of European catfish, *Silurus glanis*. Aquat. Living Resour., 11: 341-345.

Kouřil, J., Barth, T., Hamáčková, J., 1987. Stripping the females of sheatfish (*Silurus glanis* L.) with LH-RH analog induction. Práce VÚRH Vodňany, 16: 62-68.

Kouřil, J., Linhart, O., Hamáčková, J., 1992. Artificial propagation of *Silurus glanis* L. In: R.Berka [Ed.]. Metodika VÚRH Vodňany 1-14.

Kouřil, J., Hamáčková, J., Linhart, O., Barth, T., Glubokov, A.I., Haffray, P., 1996a. Induced ovulation of the European catfish by carp pituitary, GnRH analogue and/or dopamine inhibitor isofloxythepin. Živ.Výr., 41: 205-207.

Kouřil, J., Hamáčková, J., Kozák, P., 1996b. Vliv různé úrovně výživy generačních sumců obojího pohlaví v předvýtěrovém období na produkční a reprodukční ukazatele In: Kozák, P., Hamáčková, J. (eds.). Sborník referátů z Ichtyologické konference. s. 195-200.

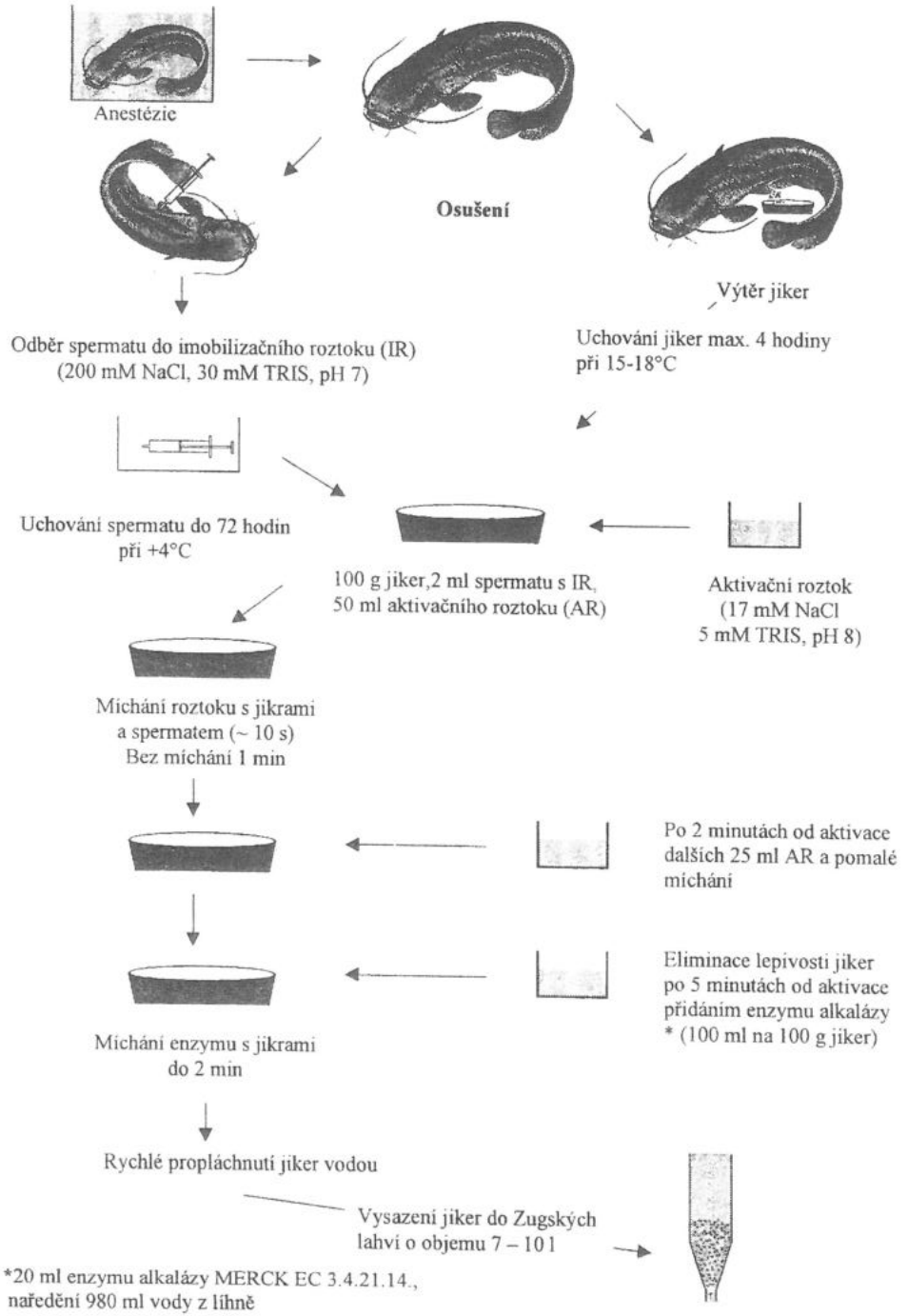
Kudo, S., Linhart, O., Billard, R., 1994. Ultrastructural studies of sperm penetration in the egg of the European catfish (*Silurus glanis* L.). Aquat.Liv.Res., 7(2): 93-98

Linhart, O., Proteau, J-P., 1993. *Silurus glanis* L.: Market and prospects of development in Europe. In: P.Kestemont and R.Billard (eds.). Aquaculture of freshwater species (except salmonids). Toremollinos, EAS, Spec. Publication, 20: 16-18.

Linhart, O., Billard, R., 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis* L.) after GnRH implantation and injection of carp pituitary extracts. J.Appl.Ichtyol., 10: 182-188.

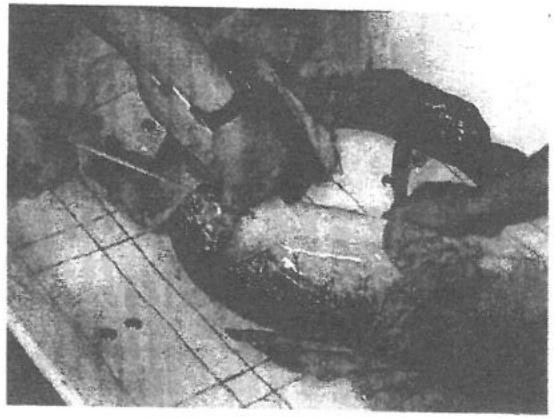
Linhart, O., Billard, R., 1995. Survival of ovulated oocytes and ova in the European catfish (*Silurus glanis* L.) after in vivo and in vitro storage or exposure to various solutions. Aquat.Living Resour., 8: 317-322.

Obr. 13: Schéma umělého výtěru sumce



*20 ml enzymu alkalázy MERCK EC 3.4.21.14.,
naředění 980 ml vody z líhně

dále migrující k periferii (tzv. poloha 2 - 4) a oocyty bez jader. Vzhledem k tvarové nesouměrnosti oocytů sumců se nepoužívá detailní určování polohy jádra.



Obr. 3: Odběr oocytů (foto M. Rodina)

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

Období vrcholné předvýtěrové zralosti se podle místních klimatických podmínek dostavuje u generačních sumců v průběhu měsíce června. Rybníky s mlíčáky optimálně lovíme 3 dny a jikernačky 2 dny před plánovaným umělým výtěrem. Zásadně se musíme vyvarovat nebezpečí přidušení a poškození ryb (díky vyšší teplotě vody se zvyšuje aktivita ryb). Stres ryb minimalizujeme při převozu v co nejvyšší míře okysličováním vody (na 2000 l vody v přepravní bedně dáváme maximálně 80-100 kg ryb)!

a) Kritéria pro zařazení jikernaček do výtěru

okamžité zařazení:

- dobrý zdravotní stav,
- typický samičí výraz v podobě zvětšené břišní partie,
- po masáži břišní partie došlo k vytření několika (2 – 3) kusů jiker.
- v odebraných oocytech se nachází druhá velikostní skupina uniformních jiker s malým množstvím rozpadlých oocytů a polohou jádra mimo centrální pozici tzn. 2 - 4.

zařazení po 1 - 2 týdnech:

- druhá velikostní skupina oocytů po odběru není jednotná, oocyty jsou menší než 2,0 mm, jádro v oocytech u větší velikostní skupiny je v centrální pozici 1, není viditelný žádný rozpad oocytů,
- po masáži břišní partie nedošlo k vytření několika kusů jiker.

vyřazení z výtěru:

- špatný zdravotní stav,
- bez typického samičího výrazu, tj. zvětšené břišní partie,
- po masáži břišní partie došlo k vytření velkého množství jiker spolu s ovariální plasmou obsahující rozpadlé oocyty,
- v odebraných oocytech se nachází druhá velikostní skupina uniformních jiker s velkým množstvím rozpadlých oocytů a oocytů bez jádra.

b) Kritéria pro zařazení mlíčáků do výtěru

Okamžité zařazení:

- dobrý zdravotní stav,
- po masáži břišní dutiny se objeví náznaky spermatu v moči.

Zařazení po 1 - 2 týdnech:

- po masáži břišní dutiny se neobjeví náznaky spermatu v moči.

Vyřazení z výtěru:

- špatný zdravotní stav.

Vybraní mlíčáci a jikernačky se převezou na líheň do přípravných žlabů se separátními odděleními (vždy 3-4 oddělení na 1000 l vody) s vodou vytemperovanou na teplotu v rybníce a další vybraní jedinci se opět vysadí do připraveného rybníka pro pozdější výtěr. Dle počtu k výtěru připravených jikernaček nalovíme a do žlabů v líhni přemístíme stejné množství mlíčáků v případě, že u nich bylo nalezeno sperma v moči po masáži břišní partie. Pokud sperma nebylo nalezeno, umístíme do žlabovny k výtěru 60 % mlíčáků a 40 % jikernaček.

Přípravné žlaby postupně temperujeme na optimální teplotu 22 ^{0}C se zajištěním dostatečného průtoku a množstvím O_2 ve vodě. Žlaby je nutné zabezpečit proti poranění a vyskočení ryb.

5. Hormonální stimulace generačních sumců

Předem vybrané generačky sumce se stimulují k výtěru jednorázovou vnitrosvalovou injekcí roztoku kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce 5 mg.kg^{-1} živé hmotnosti ryby. Mlíčáky injikujeme v rozmezí 24-48 h před vlastním výtěrem mlíčáků. Optimální spermiace byla zjištěna 48 h po injikaci, nicméně v některých případech je postačující i injikace 24 h před vlastním výtěrem mlíčáků. Jikernačky injikujeme jednorázově při teplotě 22 ^{0}C 23 h před vlastním výtěrem. K ovulaci dochází zhruba po 500 hodinových stupních. Po 22 hodinách (podle skutečného průběhu teplot vody) od injikace je vhodné 1-2x kontrolovat připravenost jikernaček k výtěru, a to šetrným nadzvednutím jikernačky a posouzením, zda-li nedochází k samovolnému výronu jiker (obr. 4 a 5). V žádném případě neprovádíme hrubou břišní masáž jikernačky. Jikernačky jsou v tomto období velmi citlivé na stres.

Obr. 4: Manipulace s generační rybou (foto M. Rodina)

Obr. 5: Detail pohlavní papily ovulující jikernačky (foto M. Rodina)

nalití do láhve slepují k sobě nebo na stěny láhve, snížením hladiny vody v láhvi a krátkým rychlým roztočením jiker tento problém odstraníme. Jikry se lepí především ze dvou důvodů:

1) špatně provedené odlepkování enzymem (nepřesná koncentrace roztoku, nedodržení dvouminutové doby odlepkování),
2) nízká teplota vody v láhvi (optimum je 22-23 ^{0}C).

V průběhu inkubace jiker denně odstraňujeme uhynulé jikry a provádíme preventivní koupele jiker roztokem Wescodynu dvakrát denně v koncentraci 2 ml.l^{-1} při teplotě vody 22 °C.

Plůdek se kulí za 2,5 - 3 dny při teplotě 22 - 23 ^{0}C. Vykulený plůdek se přeplaví nebo přenese po odstranění zbytků obalů z jiker do žlabů EWOS s kolíbkami o objemu 200 l vody. Výška hladiny vody činí 10-12 cm s přítokem vody (0,2-0,4 l.min^{-1}) a teplotou 23-25 ^{0}C. Nasazuje se do 10 tis. ks váčkového plůdku na kolíbku. Žlab se plně překryje černou folií. Z rohů kolíbek se v průběhu 2 - 3 dnů odsává čistý plůdek do čistého žlabu EWOS bez kolíbek v množství okolo 50 tis. ks na žlab. Druhou variantou je přeplavení plůdku přímo na žlab bez kolíbek v množství do 100 000 ks, přičemž je třeba plůdek několikrát za den čistit od kalu a uhynulého plůdku. Stejně jako u první varianty se žlab plně překryje černou folií a z rohů se v průběhu 2 - 3 dnů odsává čistý plůdek do čistého žlabu EWOS bez kolíbek.

Odkrm plůdku se provádí od 3 - 4 dne po vykulení plůdku startérovými krmivy při teplotě 25 ^{0}C. Plůdek se vysazuje do rybníků po dosažení velikosti alespoň 1,5 cm, tzn. po 10 denním odkrmu startérovými krmivy.

Dovětek autorů

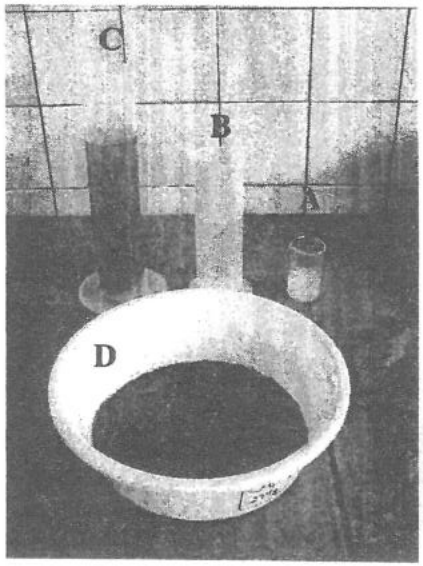
V případě dodržení všech metodických pokynů bude vaším výsledkem minimálně 95% kulivost váčkového plůdku.

Poděkování

Výzkumné práce, na jejichž základě vznikla tato metodika, byly umožněny autorům díky projektu EU CIPA-CT93-0274 v letech 1994-1997 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, MSM 126100001 od roku 1999.

Po 2 minutách od aktivace gamet se přidá dalších 25 ml aktivačního roztoku na 100 g jiker. Od okamžiku aktivace osemeněných jiker se měří čas! Po dobu aktivace opatrně mícháme jikry.

Po 5 minutách od aktivace gamet se provede odlepkování enzymem alkalázou (Alcalase, Merck EC 3.4.21.14.). Podle kvality vody v líhni se enzym v objemu 20 ml enzymu (nižší dávka pro čistší vodu) dávkuje do 980 ml vody z líhně 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 3x za sebou propláchnou čistou vodou z líhně o teplotě 20°C (obr. 12) nebo v případě, že inkubační láhve nejsou napojeny na recirkulační okruh, se přímo nalijí do alespoň 3x většího objemu vody v inkubační láhvi a velkým průtokem vody v láhvi se enzym odstraní. Celý postup znázorňuje obr. 13.



Obr. 11: Příprava na oplození jiker
A sperma v imobilizačním roztoku,
B aktivační roztok,
C roztok enzymu,
D jikry (foto M. Rodina)

Obr. 12: Vysazení jiker po odlepkování (foto M. Rodina)

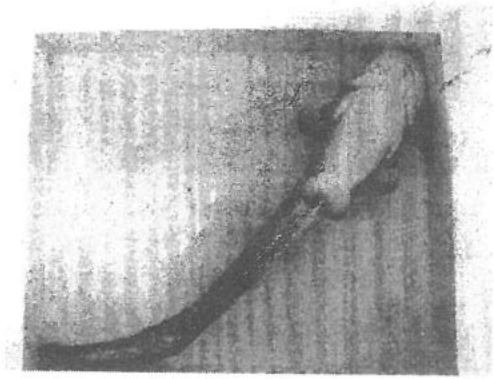
11. Inkubace jiker a rozplavání plůdku

Oplozené a odlepkované jikry nasazujeme do inkubačních lahví pro kaprovité ryby (Zugské láhve) nejvýše do dvou třetin objemu láhve, tzn. do 10 l láhve až 100000 jiker o suché hmotnosti 600 - 650 g. Po dostatečném propláchnutí jiker seřídíme průtok vody tak, aby jikry v láhvi jemně vířily, ale nebyly vyplavovány přes okraj láhve. V případě, že se jikry po

U jikernaček je možné použít GnRH nebo LHRH analogů případně v kombinaci s pimozidem, jak je uváděno v odborné literatuře. Výsledky nikdy nebyly lepší než tradiční hypofýza nebo spíš horší, proto je po zkušenostech nedoporučujeme. Nevýhodou použití GnRH nebo LHRH analogů je pozdější výtěr jikeranček o 5-10 h od injikace s poměrně velkým časovým roztažením ovulace. Naopak při použití kapří hypofýzy je výtěr optimálně časově synchronizován.

6. Anestézie před umělým výtěrem

Před umělým výtěrem nebo biopsií generační ryby anestetizujeme vhodným přípravkem pro ryby (např. 2-phenoxyethanol, Merck, s dávkováním 1 – 3 ml anestetika na 10 l vody). Další možností je využití hřebíčkového oleje v objemu 0,3 ml na 10 l vody. Ryby jsou plně anestezovány po celkovém znehybnění a otevření víček žaberního aparátu (obr. 6). Po vyzvednutí generačky uchopením za prsní ploutve nesmí dojít k pohybu ocasní části (obr. 4).



Obr. 6: Generační sumec v lázni anestetika (foto M. Rodina)

7. Odběr spermatu sumce velkého

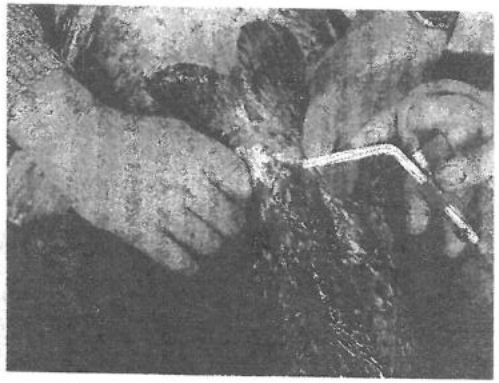
Po naprosté anestézii mlíčáků sumce a vyzvednutí z lázně anestetika se na několik minut mlíčák podrží ve vertikální poloze a nechá se samovolně odtéci moč (obr. 4). Následně se mlíčák položí na výtěrový stůl nejlépe opatřený molitanem a uvede do fixní, tzv. „Mrkvanovy polohy" (obr. 7). Následně se fyzicky náročnou masáží od přední partie břicha ve směru k pohlavní papile oběma rukama současně stiskem břišní části mezi palcem a ohnutým ukazovákem (viz obr. 8) po dobu 10 - 15 minut vytírá moč, později moč se spermatem (opaleskující přítomnost spermatu) a v závěru koncetrovanější sperma (mléčné zabarvení). Moč se spermatem nebo koncentrovanější sperma odsáváme do zkumavek nebo kádinek s imobilizačním roztokem. Před odběrem spermatu plníme zkumavky nebo odběrné kádinky do poloviny objemu imobilizačním roztokem. Zkumavky s roztokem můžeme do odběru spermatu uchovat při pokojové teplotě (cca 20 ^{0}C). Imobilizační roztok (11,7 g NaCl, 3,6 g trisu, pH 7 s HCl do 1 l destilované vody) se může maximálně naředit spermatem s močí do úrovně 1:1.

Sperma ředěné imobilizačním roztokem se uchovává ve zkumavkách (obr. 9) nebo ve speciálních kontejnerech pro buněčné kultury (obr. 10) v ledničce nebo polystyrénovém

kontejneru při +4 ^{0}C na plocho s desetinásobkem objemu vzduchu. Vzduch je nutný pro dobré zabezpečení respirace spermií až po dobu 3 dnů.

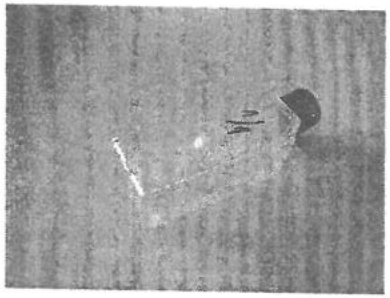
Sperma sumce je vždy naředěno močí. Moč se se spermatem samovolně směšuje při masáži břišní partie, a tím i masáží varlat a močového měchýře. Objem močového měchýře je poměrně velký, podle velikosti generační ryby zhruba 50 - 100 ml. Moč odebraná z močového měchýře je čirá, bez přítomnosti spermií, s osmotickou koncentrací na úrovni 50 mOsmol.kg^{-1}. Testikulární sperma vykazuje osmolalitu na úrovni od 500 mOsmol.kg^{-1} tzn., že moč plně aktivuje spermie.

Obr. 7: "Mrkvanova poloha" (foto M. Rodina)



Obr. 8: Odběr spermatu (foto M. Kocour)

Obr. 9: Odsávačka na odběr spermatu (foto M. Rodina)



Obr. 10: Kontejner pro buněčné kultury (foto M. Rodina)

Sperma sumce velkého je řídké až oligospermní, barvy slabě mléčné nebo jen s opaleskujícím zákalem. Po odběru spermatu vykazují spermie sumce pohyblivost bez aktivace vodou (vlivem kontaminace močí). Po naředění spermatu vodou byla doba postupného pohybu hromadného spermií 41 s, pohyb spermií skončil po 121 s. Průměrný objem spermatu činil 9,6 - 14,6 ml. Průměrná koncentrace spermií v ml spermatu se pohybovala na úrovni 0,63-1,63.10^9 ks^{-1}, celkový počet spermií na mlíčáka byl zjištěn v rozmezí 9,69-28,75.10^9 ks a

relativní počet spermií na kg hmotnosti v rozmezí 1,38 - 6,18·10^9 ks. Projevil se vždy kladný vliv imobilizujícího roztoku na uchování pohyblivosti spermií.

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

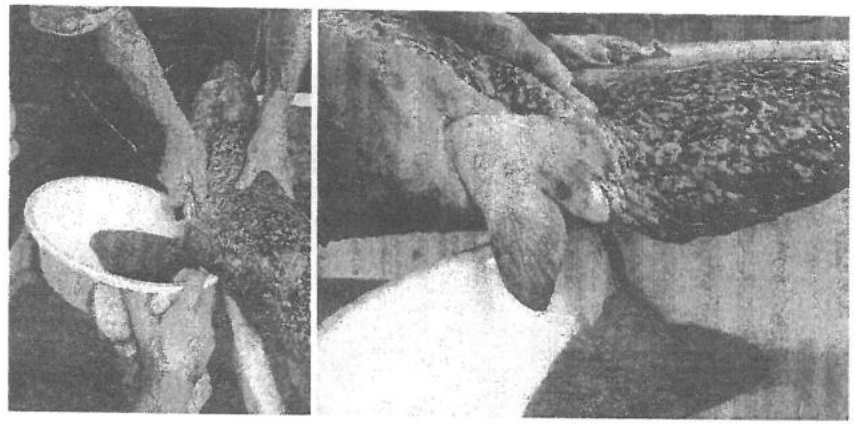
Metoda tzv. přímého výtěru mlíčáků na jikry se v žádném případě nedoporučuje vzhledem k aktivaci jiker močí a tím i snížení úrovně fertility jiker a kulení váčkového plůdku.

8. Plodnost jikernaček sumce velkého

Přirozený výtěr sumce velkého probíhá obvykle v červnu a vyznačuje se jednorázovým výtěrem jikernaček. Plodnost jikernaček je na úrovni od 10000 do 25000 jiker.kg^{-1} hmotnosti jikernaček. Průměr suchých jiker je variabilní 1,8 - 2,5 mm, hmotnost činí 6 - 6,5 mg.ks^{-1} s počtem 160 ks jiker v 1 g.

9. Výtěr jikernaček

Před výtěrem anestezovanou jikernačku osušíme. Jikry vytíráme do předem zvážených suchých misek a jikry se váží. Výtěr se musí provádět opatrně, aby se moč nebo výkaly nedostaly mezi jikry. Přepočtem (v 1 g jiker je cca 160 kusů jiker) se zjišťuje plodnost jikernaček po výtěru. Údaje se zaznamenávají do výtěrových listů. Misky s jikrami se přikryjí čistou vlhkou utěrkou a umístí ve stínu na chladné podlaze líhně nejvhodněji při stejné teplotě okolo 18 - 20 °C. Tímto způsobem je možné zhruba do 3 hodin po výtěru jikry krátkodobě uchovat (Linhart a Billard, 1995).



Obr. 11: Výtěr jikernačky (foto M. Rodina)

10. Umělé osemenění jiker, aktivace, odlepkování

Jikry od každé jikernačky se osemení heterospermicky v dávce 2 ml heterospermatu v imobilizačním roztoku na každých 100 g jiker.

Aktivace se provádí okamžitě nebo současně po dokončení osemenění objemem 50 ml aktivačního roztoku na 100 g jiker. K aktivaci používáme aktivační roztok (1 g NaCl, 0,6 g trisu, pH 8 s HCl do 1 l destilované vody), popřípadě čistou vodu z líhně o teplotě 22 - 23 °C.