

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Ověření technologie hromadné indukce  
triploidie u sivena amerického v  
provozních podmínkách pstruhařství**

Autor práce: Kateřina Švagrová

Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.

Konzultant: Ing. Miloš Havelka, PhD.

Studijní program a obor: Zootechnika, rybářství

Forma studia: kombinovaná

Ročník studia: 3.

České Budějovice, 2014

## **Prohlášení autora bakalářské práce**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 30.4. 2014

.....

Kateřina Švagrová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu prof. Ing. Martinu Flajšhansovi, Dr. rer. agr. za vedení celé práce, za poskytnutí užitečných rad, ale také za ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Miloši Havelkovi, Ph.D. za pomoc při praktické části experimentu, za jeho trpělivost a za poskytnutí materiálů. Také bych chtěla poděkovat své rodině za finanční i psychickou podporu během celého studia.

*Kateřina Švagrová*

Zadání Bp

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>9</b>
2.1. Co je polyploidie?.....	9
2.1.1. Výhody polyploidie.....	10
2.1.2. Nevýhody polyploidie.....	11
2.1.3. Triploidie.....	11
2.1.4. Tetraploidie .....	12
2.2. Indukce triploidie a tetraploidie .....	12
2.2.1. Teplotní šoky.....	14
2.2.1.1. Chladový šok.....	14
2.2.1.2. Teplý šok .....	15
2.2.2. Hydrostaticky tlakový šok .....	15
2.2.3. Mechanické šoky.....	16
2.2.4. Chemické šoky .....	16
2.2.5. Křížení.....	17
2.3. Metody identifikace triploidie.....	17
2.3.1. Nepřímé metody.....	17
2.3.1.1. Měření jaderných a buněčných velikostí.....	17
2.3.1.2. Počítání jadérek .....	18
2.3.1.3. Coulterova metoda .....	18
2.3.1.4. Morfologicko-anatomické odlišnosti triploidů.....	18
2.3.2. Přímé metody .....	19
2.3.2.1. Počítání chromozomů v buňkách .....	19
2.3.2.2. Kvantifikace obsahu DNA .....	19
2.3.2.3. Proteinová elektroforéza .....	20
2.4. Užitékové vlastnosti triploidů .....	20
<b>3. Materiál a metodika.....</b>	<b>22</b>
3.1. Charakteristika generačních ryb .....	22
3.2. Umělý výtěr a oplození jiker .....	23
3.3. Indukce triploidie .....	24
3.3.1. Technologické sestavy pro indukci triploidie .....	24

3.3.2. Indukce triploidie teplým šokem.....	25
3.3.3. Indukce triploidie tlakovým šokem.....	25
3.4. Inkubace jiker .....	25
3.5. Ověřování triploidie.....	26
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>27</b>
4.1. Oplozenost jiker .....	27
4.2. Líhnivost .....	28
4.3. Výsledek ověřování účinnosti triploidie u teplého a tlakového šoku .....	29
4.4. Porovnání a zhodnocení teplého a tlakového šoku.....	32
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>33</b>
5.1. Oplozenost a líhnivost jiker.....	33
5.2. Účinnost tlakového šoku.....	34
5.3. Účinnost teplého šoku .....	34
5.4. Porovnání a zhodnocení teplého a tlakového šoku.....	35
<b>6. Závěr .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>37</b>
<b>8. Seznam obrázků, grafů, tabulek a příloh .....</b>	<b>43</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>45</b>
<b>10. Abstrakt .....</b>	<b>49</b>
<b>11. Abstract.....</b>	<b>50</b>

# 1. Úvod

V dnešní akvakultuře se u širokého spektra rybích druhů často setkáváme s modernizací chovatelských postupů. Jedním ze způsobů, jak zlepšit užitkové vlastnosti chované populace daného druhu ryby, je umělá indukce polyploidie. Nejčastěji se u ryb uměle indukuje triploidie. Umělá indukce triploidie se také nazývá triploidizace. Výzkumem indukce triploidních ryb a jejich biologickými a užitkovými vlastnostmi se zabývala celá řada autorů už od 70. let 20. století.

Především u sivenů amerických by měla triploidizace v akvakultuře velký význam, neboť triploidní ryby vykazují značné výhody.

Patří mezi ně například úplná nebo genetická sterilita triploidních ryb. Odchované sterilní ryby jsou vhodné pro vysazování do volných vod, zejména do sportovních rybářských revírů, protože negativně geneticky nenarušují původní rybí populace, jelikož mezi nimi nedochází ke křížení. U triploidních ryb se snižuje agresivita a teritoriální chování, tím se zamezí vzniku vnějších poranění ryb, které vznikají napadáním samců stejného druhu a sníží se tak úmrtnost ryb v intenzivních chovech

Další velkou výhodou, kterou vykazují triploidní ryby, je jejich zvýšený růst. Diploidní jedinci využívají část živin a energie z potravy do tvorby gonád a zrání gamet, kdežto sterilní triploidní jedinci veškerou energii a živiny transformují do tělesného růstu. Uvádí se, že v závislosti na druhu triploidní ryby rostou až o 15 – 20 % rychleji než diploidní jedinci. Z toho důvodu by se dala produkce triploidních ryb aplikovat pro intenzivní chovy užitkových ryb nebo také pro sportovní rybolov. V dnešní době sportovní rybáři vyhledávají stále častěji trofejní ryby a triploidizace je jednou z možností, jak docílit toho, aby siveni dorůstali větších rozměrů. Neopomenutelnou předností triploidních jedinců je i zlepšení organoleptických vlastností masa, protože diploidní ryby v reprodukčním období mobilizují dostupné energetické zdroje, a mají tak např. méně tuku ve svalovině.

Cílem této práce bylo v přehledové části zhodnotit způsoby triploidizace u ryb, její význam a způsoby stanovení triploidie. V experimentální části jsem se podílela na indukci triploidie u sivena amerického *Salvelinus fontinalis* v provozních podmínkách rybí líhně na Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s.r.o. za pomoci tlakového a teplého šoku.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Co je polyploidie?

Změny v počtu chromozomů a změny struktury DNA hrály rozhodující úlohu ve vývoji všech eukaryotních organismů. Nejdramatičtější změny nastaly přes proces známý jako polyploidie, při které dochází k násobení sádek chromozomů (Leggatt a Iwama, 2003). Organismy, jež mají v somatických buňkách více než dvě sádky chromozomů, se nazývají polyploidi (Pifferrer a kol., 2009). S tímto jevem se můžeme setkat jak v rostlinné, tak v živočišné říši (Comai, 2005). Polyploidie byla zaznamenána u mnoha skupin obratlovců, jako jsou například savci, obojživelníci a ryby (Pifferrer a kol., 2009). Konkrétně u ryb je polyploidie rozšířena například u řádů bahníků, jeseterů, veslonosů a široce se vyskytuje napříč nadřádem Ostariophysi (Flajšhans a kol., 2013).

Polyploidii rozdělujeme podle způsobu jejího vzniku na autopolyploidii a allopolyploidii (Comai, 2005). Autopolyploidie vzniká v rámci jednoho druhu, oproti tomu k allopolyploidii dochází v rámci mezidruhového křížení (Flajšhans a kol., 2013; Pifferrer a kol., 2009).

Polyploidie může vzniknout buď narušením mitózy či meiózy (Ramsey a Schemske, 1998; Comai, 2005; Flajšhans a kol., 2013; Pifferrer a kol., 2009), nebo vzácněji i za jiných podmínek (Flajšhans a kol., 2013). Jde-li o narušení mitózy nebo meiózy, hovoříme o autopolyploidii (Flajšhans a kol., 2013). Při autopolyploidii dochází k potlačení prvního nebo druhého meiotického dělení (Pifferrer a kol., 2009). Důsledkem autopolyploidie je vznik gamet, které mají více než jednu sádku chromozomů. Při sloučení takových gamet s běžnými haploidními vzniká polyploidní zygota (Ramsey a Schemske, 1998; Comai, 2005). Autopolyploidii mohou vyvolat i okolní podmínky, které mohou způsobit poruchy při spojení vajíčka se spermií (Flajšhans a kol., 2013). Další možností vzniku autopolyploidie je polyspermické oplození, při němž dochází k vniknutí více spermií do vajíčka (Flajšhans a kol., 2013; Purdom, 1983).

Druhou možností vzniku polyploidního stavu je allopolyploidie. K allopolyploidii může dojít při křížení dvou různých druhů nebo rodů ryb (Comai, 2005; Flajšhans a kol., 2013). Při hybridizaci vzdálených druhů může dojít k výrazným genetickým



změnám v důsledku rozdílných genomů obou rodičů (Flajšhans a kol., 2008). V Evropě se vyskytuje několik druhů ryb, které se mezidruhově kříží, jako je například karas stříbřitý *Carassius auratus* a iberie ouklejovitá *Iberocypris alburnoides* (Ráb a kol., 2006). U losovitých dochází v přírodních podmínkách ke křížení pstruha potočního *Salmo trutta* a sívena amerického *Salvelinus fontinalis*. Vzniklý hybrid se nazývá tygrovaná ryba (McKay a kol., 1992).

Jestliže dochází k allopolyploidii nebo autopolyploidii přírodní cestou bez zásahu člověka, hovoříme o spontánní polyploidii. (Flajšhans a kol., 2013).

Polyploidní organismy označujeme v závislosti na počtu chromozomových sádek. Celkový počet chromozomových sádek je indikován prefixem, například tri - ( 3 ), tetra - ( 4 ), penta - ( 5 ), hexa - ( 6 ), a okta - ( 8 ) (Comai, 2005).

### **2.1.1. Výhody polyploidie**

Comai (2005) uvádí tři zdokumentované nebo zjevné výhody polyploidie. První dvě, heteróze a nadbytek alel, jsou výsledkem zdvojení genu. Heteróze autopolyploidů je výraznější než u diploidních jedinců z důvodu větší variability genomů (Auger a kol., 2005).

U hybridních allopolyploidních jedinců je heteróze vysoká z důvodu vzdáleného genomu rodičů obou druhů. Nadbytek alel chrání jedince před nepříznivými vlivy mutací. Třetí výhodou je nepohlavní, resp. jedнопohlavní (unisexuální) rozmnožování, které umožňuje reprodukci jedincům některých polyploidních populací i v nepřítomnosti opačného pohlaví stejného druhu (Comai, 2005). Hlavní výhodou pro akvakulturu je sterilita nebo částečná sterilita polyploidních ryb (Benfey, 1999). Částečná sterilita vede k tvorbě aneuploidních gamet (Comai, 2005), které nedokáží vytvořit životaschopné potomstvo po oplození vajíčka (Ueda a kol., 1987). U některých čeledí mohou triploidní samci rozvíjet mnohem větší pohlavní žlázy na rozdíl od triploidních samic a často také mohou produkovat funkční aneuploidní spermie (Benfey a kol., 1986; Solomon, 2003; Rottmann a kol., 1991). Důvod, proč se úroveň sterility triploidních ryb liší druhem a pohlavím, je zatím nejasný (Linhart a kol., 2006).

### 2.1.2. Nevýhody polyploidie

Nevýhodou polyploidie je zvýšení obsahu genetického materiálu organismu, který obvykle zvyšuje velikost buňky velikost jaderného obalu. To může mít za následek vytvoření fenotypových abnormalit, které mají vliv na zdraví organismu (Comai, 2005). Nevýhodou může být také nesnadné proniknutí diploidní spermie přes mikropyle jikry (Chourrout a kol., 1986). Hlavní nevýhodou uměle navozené polyploidie v akvakultuře je snížená míra přežití oproti diploidním protějškům (Solomon, 2003).

### 2.1.3. Triploidie

Jak už název napovídá, triploidní jedinci mají tři sádky ( $3n$ ) chromozomů ve svých somatických buňkách, na rozdíl od běžného diploidního stavu, kdy somatické buňky obsahují pouze 2 sádky chromozomů ( $2n$ ) (Benfey, 2001; Rottmann a kol., 1991). Vývoj gamet u diploidů pro pohlavní rozmnožování se uskutečňuje pomocí meiotického buněčného dělení, které zahrnuje dvě následná jaderná dělení, ale jeden cyklus replikace DNA, což umožňuje segregaci jedné kopie každého homologního chromozómu do každé nové gamety. Přítomnost jedné sady chromozomů v gametě (haploidie,  $1n$ ) a splynutí gamet při pohlavním rozmnožování zajišťují znovunastolení diploidního stavu nového organismu (Flajshans a kol., 2010; Rottmann a kol., 1991). V některých případech může dojít k občasnému selhání druhé fáze meiotického dělení, kdy se neoddělí druhé pólové tělísko, a to vede k přirozenému výskytu triploidních jedinců (Thorgaard a Gall, 1979). Při cílené produkci triploidních jedinců dochází k indukci až po oplození jikry (Rottmann a kol., 1991).

V přírodě jsou u několika druhů popsány přirozeně se vyskytující triploidní populace, většinou se jedná pouze o celosamičí populace, které se rozmnožují se samci jiného druhu (Purdom, 1983). Autoři uvádějí například výskyt triploidních karasů stříbřitých a sekavců *Cobitis* spp. (Ráb a kol., 2006).

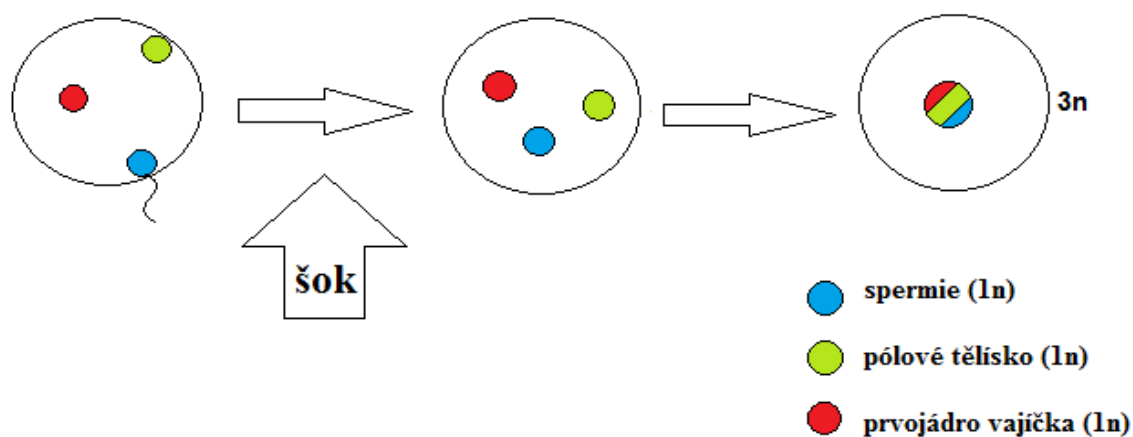
#### 2.1.4. Tetraploidie

Tetraploidie hrála roli ve vývoji mnoha ekonomicky důležitých skupin ryb, včetně lososovitých (Allendorf a Thorgaard, 1984). Byl také zaznamenán přirozený výskyt tetraploidie u některých druhů ryb, například u piskoře dálnovýchodního *Misgurnus anguillicaudatus*, karase stříbřitého, parmy obecné *Barbus barbus* a sekavce nagasackého *Cobitis biwae* (Pandian a Koteeswaran, 1998).

### 2.2. Indukce triploidie a tetraploidie

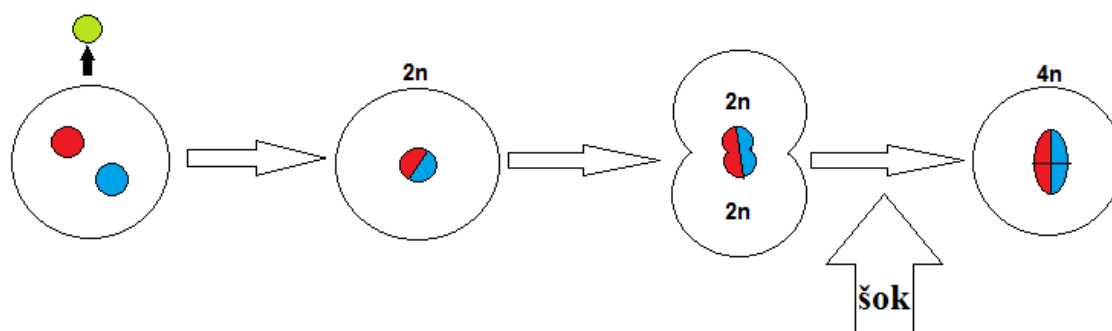
Indukce triploidů je již známa od čtyřicátých let dvacátého století (Ihsen a kol., 1990). U mnoha druhů ryb bylo polyploidie dosaženo působením různých fyzikálních (mechanických, teplotních, tlakových) a chemických šoků, jež blokují meiotické dělení a zabraňují oddělení druhého pólového tělíska z jikry v první hodině po oplození (Tiwary a kol., 2004; Pandian a Koteeswaran, 1998). Mechanické šoky se v produkční akvakultuře téměř nepoužívají, zejména z důvodu nízké účinnosti a vysoké mortality, zatímco další typy fyzikálních šoků jsou dnes často používané k indukci polyploidie u ryb. Mezi ně řadíme šok chladový, tepelný a tlakový (Flajšhans a kol., 2013).

Šok způsobuje v oplozené jikře depolymerizaci tubulinu, což je hlavní stavební látka dělicího vřeténka, které slouží k oddělení druhého pólového tělíska. Proto nedojde k oddělení druhého pólového tělíska a výsledná jikra tak ponese 3 sádky chromozomů (1. sádka ze spermie, 2. z jikry, 3. z pólového tělíska) (Obr. č. 1) (Flajšhans a kol., 2010; Rottmann a kol., 1991; Tiwary a kol., 2004).



Obr. č. 1: Průběh indukce triploidie (upraveno podle Flajšhane a kol., 2013)

Tetraploidie může být indukována jak krátce před prvním mitotickým dělením, tak i před druhým nebo třetím dělením oplozené jikry (Nagoya a kol., 1990). V důsledku fyzikálního nebo chemického šoku dojde k inhibici cytokineze (Pandian a Koteeswaran, 1998). Průběh indukce tetraploidie je znázorněn na Obr. č. 2. Tetraploidie byla indukována u druhů ryb, jako je například *Megalobrama amblycephala*, *Misgurnus mizolepis* (Pifferer a kol., 2009). V praxi se indukce tetraploidie na rozdíl od indukce triploidie u ryb dnes téměř nepoužívá. A to především z hlediska vysoké mortality a náchylnosti jedinců na vnější podmínky (Flajšhans a kol., 2008).



Obr. č. 2: Průběh indukce tetraploidie (upraveno podle Flajšhane a kol., 2013)

Indukce polyploidie je založena na třech podmínkách, které je důležité dodržet a správně zkombinovat. První podmínkou je doba aplikace šoku po oplození jikry, druhá podmínka je intenzita šoku a třetí je expoziční doba šoku (Flajšhans a kol., 2013; Felip a kol., 1997). Přesné načasování a intenzita šoku je základem pro vysokou indukci polyploidie ryb, tyto proměnné závisí na druhu ryby a teplotě vody (Rottmann a kol., 1991). Pro získání 100 % triploidního potomstva je nutné dodržení přesného protokolu (Pifferer a kol., 2009), jenž zahrnuje kritické hodnoty proměnných pro konkrétní rybí druh (Pifferer a kol., 2000; 2003). Indukce triploidie v kombinaci s hormonálním zvratem pohlaví může vést k vytvoření samicí, samčí, nebo celosterilní populace (Pandian a Koteeswaran, 1998). Teplotní a tlakové šoky jsou dnes obecně známými metodami indukce triploidních ryb (Solomon, 2003).

### **2.2.1. Teplotní šoky**

Teplotní šoky jsou založeny na přenesení oplozených jiker do lázně s vodou s výrazně nižší nebo vyšší teplotou. Teplotní šoky se dělí na chladový a teplý (Flajšhans a kol., 2013). Výhodami teplotních šoků jsou nízké náklady na realizaci, jednoduchost a vysoká účinnost (Tiwary a kol., 2004; Rottmann a kol., 1991).

#### **2.2.1.1. Chladový šok**

Chladový šok je založen na přenesení oplozených jiker do lázně s výrazně nižší teplotou vody, než je přirozená teplota vody při inkubaci. Zchlazení vody se provádí ledem (Flajšhans a kol., 2008). Chladový šok začíná 2 až 7 minut u teplomilných druhů ryb a 15 až 20 minut u studenomilných druhů ryb po oplození jiker. Poté jsou jikry přemístěny do lázně s vodou o teplotě -1 až 4 °C po dobu od 2 do 20 minut (Pifferer a kol., 2009), tato doba je však závislá na druhu ryb. Existují případy, kdy chladový šok trvá i několik hodin (Flajšhans a kol., 2013). Chladový šok je účinnější především u teplomilných druhů ryb (Thorgaard a Gall, 1979), ale existují i výjimky. Například u tilápie *Oreochromis niloticus* byla zjištěna 100% indukce triploidie při tepelném šoku (Varadaraj a Pandian, 1988).

### **2.2.1.2. Teplý šok**

Teplý šok je založen na přenesení oplozených jiker do lázně s výrazně vyšší teplotou vody, než je přirozená teplota vody při inkubaci. Teplé šoky se provádí 2-7 minut u teplomilných a 15-20 minut u studenomilných druhů ryb po oplození jiker (Flajšhans a kol., 2013). Potom jsou jikry teplomilných ryb přemístěny do lázně s teplotou vody 34-41 °C po dobu 45 sekund - 3,5 minuty. U studenomilných ryb se jikry po oplození přemístí do lázně o teplotě vody 24-32 °C po dobu 10-25 minut (Pifferer a kol., 2009). Expoziční doba je rozdílná v závislosti na druhu ryby (Flajšhans a kol., 2013). Výsledky tepelných šoků jsou velice variabilní a přežití vzniklého triploidního potomstva může být nízké, zejména u raných stádií (Sütterlin a kol., 1987; Jungalwalla, 1991). Úspěšnou aplikaci uvádí například Benfey (1989) u lososovitých ryb.

### **2.2.2. Hydrostatický tlakový šok**

Indukce triploidie tlakovým šokem je založena na náhlém zvýšení hydrostatického tlaku na oplozené jikry pomocí tlakové jednotky (Piferrer a kol., 2009). Tlaková jednotka je většinou válcovitá nádoba vyrobená z nerezové oceli. Nádoba je uzavřená, obsahuje píst, tlakoměr, pojistný ventil a externí hydraulický lis, který umožňuje tlačít na píst (Rottmann a kol., 1991). Tato metoda, stejně jako jiné šoky, blokuje oddělení druhého pólového tělíska (Tiwary a kol., 2004). Proti tepelným šokům je tlakový šok účinnější (až 100 % účinnost) a umožňuje větší produkci triploidního potomstva (Solomon, 2003). Rottmann a kol. (1991) uvádí, že tato metoda je nejdůslednější a nejrozšířenější pro komerční produkci triploidního pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss*. U indukce triploidie pstruha duhového byla největší úspěšnost při tlaku 48 MPa, aplikovaném 40 minut po oplození jiker, po dobu 4 minut při teplotě 9,6 °C (Rottmann a kol., 1991). Pro všechny ryby je intenzita hydrostatického tlaku podobná a pohybuje se v rozmezí 58-85 MPa (Pifferer a kol., 2009).

Tato metoda byla úspěšně použita například u pstruha duhového, dánia pruhovaného *Brachydanio rerio*, kapra obecného *Cyprinus carpio*, tilápie nilské, lososa kisuč *Oncorhynchus kisutch* a jiných druhů ryb (Lou a Purdom, 1984; Hussain a kol., 1991; Pifferer a kol., 2009).

### **2.2.3. Mechanické šoky**

Mezi mechanické šoky patří otřesy a napichování jiker. Experimentálně byly tyto šoky testovány u kapra obecného. Docházelo k velkým ztrátám u potomstva, účinnost šoků byla velmi nízká, a proto se v dnešní době mechanické šoky nevyužívají. (Flajšhans a kol., 2013).

### **2.2.4. Chemické šoky**

Jedná se o aplikaci chemikálií, které zamezí odchodu pólového tělíska z oplozené jikry (Tiwary a kol., 2004). Metoda je založena na působení tzv. vřeténkových jedů nebo inertních plynů, které mají vliv na dělicí aparát buňky (Flajšhans a kol., 2013). Stejně jako u předchozích šoků i zde jsou ryby velmi citlivé na koncentrace chemických látek, počátek šoku a dobu jeho trvání (Beaumont a Fairbrother, 1991). Avšak indukce triploidie pomocí chemických látek se v akvakultuře dnes téměř nepoužívá (Flajšhans a kol., 2013).

Chemické šoky byly aplikovány na oplozených jikrách lososa obecného *Salmo salar* s aplikací chemikálie cytochalasin B (Refstie a kol., 1977), podobná aplikace chemikálie kolchicinu byla použita na oplozených jikrách sivena amerického (Smith a Lemoine, 1979). Mezi další vhodné chemikálie, které vyvolávají vysokou účinnost v produkci triploidů, patří například oxid dusný (až 79,7 % účinnost) a freon (Johnstone a kol., 1989). Další možností může být vystavení spermií nebo čerstvě oplozených jiker pstruha duhového vysokým hodnotám pH a vápníku, což vede k vysokému výskytu triploidních jedinců (Ueda a kol., 1988).

### **2.2.5. Křížení**

Další možností vzniku triploidního potomstva je křížení tetraploidních a diploidních ryb (Solomon, 2003). Sheehan a kol. (1999) uvádí, že křížením tetraploidních a diploidních ryb vznikne 100% triploidů. Hlavním problémem této metody je však odchov tetraploidních rodičů. Z důvodů jejich vysoké homozygotnosti a citlivosti vůči vnějším podmínkám není tento způsob získávání triploidů u ryb dnes využíván (Flajšhans a kol., 2008).

## **2.3. Metody identifikace triploidie**

Protože indukce triploidie nemusí být vždy úspěšná, je důležité její ověření (Rottmann a kol., 1991). Většina triploidních jedinců není morfologicky odlišitelná od diploidních jedinců svého druhu, a tudíž byly navrženy různé metody pro stanovení triploidie u ryb (Pandian a Koteeswaran, 1998).

Triploidie je potvrzována přímými nebo nepřímými metodami. Mezi nepřímé metody patří měření jaderných a buněčných velikostí, počítání jadérek, měření objemu jádra Coulterovou metodou a anatomicko-morfologické rozdíly. Přímé metody zahrnují stanovení karyotypu, kvantifikaci obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie, spektrofluometrie a mikrodenzitometrie (Flajšhans a kol., 2013).

### **2.3.1. Nepřímé metody**

#### **2.3.1.1. Měření jaderných a buněčných velikostí**

Měření rozměrů erytrocytů je nejjednodušší nepřímou metodou pro stanovení triploidie u ryb, ovšem tato metoda nepatří mezi nejpřesnější (Thorgaard a Gall, 1979). Princip metody je založen na rozdílné velikosti erytrocytů triploidních a normálních diploidních jedinců. Jaderné a buněčné velikosti erytrocytů triploidních druhů ryb jsou větší, a to z důvodu vyššího množství DNA (Small a Benfey, 1987). Metoda měření jaderných a buněčných velikostí byla úspěšně použita k identifikaci triploidie u amura bílého *Ctenopharyngodon idella* (Wattendorf, 1986) a lososa obecného (Benfey a



Sütterlin, 1984). Přesnost a spolehlivost této metody závisí především na druhu ryby, u lososa obecného se účinnost této metody pohybovala mezi 90-100% (Benfey a Sütterlin, 1984), u pstruha duhového pouze 70,8% (Tambets a kol., 1991).

#### **2.3.1.2. Počítání jadérek**

Další nepřímou metodou je počítání jadérek. Triploidní buňka obsahuje tři jadérka, oproti diploidní buňce, která obsahuje pouze jádérka dvě (Tiwary a kol., 2004). Tato metoda byla aplikována například při identifikaci triploidního karase obecného *Carassius carassius*, kapra obecného (Cherfas a Ilyasova, 1980), sumce velkého *Silurus glanis* (Linhart a Flajšhans, 1995) a pstruha duhového (Al-Sabti, 1995).

#### **2.3.1.3. Coulterova metoda**

Coulterova metoda (impedanční) je využívána nejen pro identifikaci triploidie u ryb, ale také k analýze krve u lidí a zvířat. Principem této metody je zjištění a změření velikosti buňky pomocí vodivého roztoku a elektrod (velikost elektrického impulsu je přímo úměrná buněčnému objemu) (Flajšhans a kol., 2013). Poprvé byla u ryb tato metoda testována u amura bílého (Wattendorf, 1986).

#### **2.3.1.4. Morfologicko-anatomické odlišnosti triploidů**

Morfologické rozdíly mezi diploidními a triploidními jedinci nejsou u většiny druhů ryb patrné (Tiwary a kol., 2004). Ovšem u některých druhů, jako je například amur bílý, kapr obecný, tolstolobik pestrý *Arisichthys nobilis*, byly popsány morfologické rozdíly, na jejichž základě je možné triploidní jedince od diploidních rozeznat (Tiwary a kol., 1999). Cassani a kol. (1984) uvádí až 95% přesnost vizuálního rozlišení triploidního kapra obecného a tolstolobika pestrého od normálních diploidních jedinců. Na rozdíl u druhů, jako je například pstruh duhový, jsou triploidní jedinci od jedinců diploidních morfologicky nerozeznatelní (Leary a kol., 1985).

Solomon (2003) uvádí, že morfologická změna může nastat během výtěrového období, kdy jsou diploidní ryby ve svatebním šatu a triploidním rybám zůstává běžné zbarvení.

Z anatomického hlediska bylo zaznamenáno několik rozdílů mezi triploidními a diploidními druhy (Tiwary a kol., 2004). Prvním rozdílem je rozdělení sleziny u některých triploidů, např. u pstruha duhového (Okada, 1985). Druhým rozdílem jsou gonády a jejich vývoj, který se však liší v závislosti na druhu a pohlaví ryb (Tiwary a kol., 2004). Například u pstruha duhového měly triploidní samice pouze řetězec oogonií a žádné primární oocyty ve vaječniku, u triploidních samců byla varlata podobná jako u normálních diploidních pstruhů, avšak obsah varlat obsahoval pouze spermatidy, spermatocyty a málo pohyblivých spermií (Lincoln a Scott, 1983). U triploidního pstruha duhového bylo pozorováno zvětšení mnoha orgánů a tkání, včetně mozku, svalů, sítnice, jater a sleziny (Benfey, 1999).

Nicméně tyto poměrně velké anatomické rozdíly nemají zásadní vliv na fyziologii, chování a celkovou funkci organismu ryb (Solomon, 2003).

### **2.3.2. Přímé metody**

#### **2.3.2.1. Počítání chromozomů v buňkách**

Jednou z přímých metod pro přesnou identifikaci triploidie u ryb je počítání chromozomů v buňkách (Thorgaard, 1983). Tato metoda je však velice časově náročná a jedinec, u něhož je ploidie ověřována, musí být usmrcen (Tiwary a kol., 2004). Někteří autoři ale tvrdí, že je možné připravit vzorky z ploutví, které jsou schopny regenerace (Tiwary a kol., 1997), nebo z kultury lymfocytů (Thorgaard a Gall, 1979), aniž by ryba musela být usmrcena (Tiwary a kol., 2004).

#### **2.3.2.2. Kvantifikace obsahu DNA**

Kvantifikace obsahu DNA se provádí nejčastěji pomocí instrumentálních metod, mezi které patří průtoková cytometrie, spektrofluometrie a mikrodenzitometrie. Základem této metody je permeabilizace buněčné membrány a obarvení DNA a

následné měření fluorescence. Výsledkem metody je histogram, který udává intenzitu fluorescence daných vzorků. Triploidní vzorek je na histogramu zobrazen výše než diploidní vzorek, a to 1,5x (Flajšhans a kol., 2013).

### **2.3.2.2.1. Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je dnes často používanou metodou pro identifikaci mnoha druhů triploidních ryb, jejíž hlavní výhodou je především rychlost a přesnost (Flajšhans a kol., 2013). Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady (Benfey, 2001).

Tato optická metoda je založena na měření částic fluorescence poté, co byla DNA obarvena specifickým barvivem, jako je například proprium jodid (Flajšhans a kol., 2013). Obarvený vzorek je dále identifikován v Ortho Cytofluorografu (Allen, 1983). Stanovení triploidie může být prováděno u embryí, larev, ale i u dospělých jedinců z buněk krve a tkání (Flajšhans a kol., 2013).

Úspěšně byla tato metoda použita pro identifikaci triploidů pstruha duhového (Thorgaard a kol., 1992). Podle Flajšhans a Vajcové (2000) byla identifikace pomocí průtokové cytometrie aplikována na různých úrovních polyploidie u jeseterů (*Acipenser ruthenus*, *A. gueldenstaedti* *A. baerii*).

### **2.3.2.3. Proteinová elektroforéza**

Proteinová elektroforéza je založena na oddělování proteinů z tkání (Flajšhans a kol., 2013). Na separaci proteinů jsou používány vzorky svalového myogenu nebo keratinu (Liu a kol., 1978). Metoda byla úspěšně aplikována například u triploidního mořana japonského *Pagrus major* (Sugama a kol., 1992).

## **2.4. Užité vlastnosti triploidů**

Hlavní výhodou triploidních ryb je jejich sterilita, která může přispět k zachování původních rybích populací. V případě úniku těchto ryb do volných vod nedojde k jejich rozšíření ve volné přírodě (Benfey, 2001; Solomon, 2003) a následně ke křížení, které

by způsobilo prolínání genetického materiálu (Rottmann a kol., 1991). Pokud je nutné vysazování nepůvodních druhů ryb do míst, kde to legislativa zakazuje, jsou vhodné právě triploidní jedinci, kteří negativně nenarušují danou lokalitu. Jedná se například o vysazování triploidního amura bílého. Ten snižuje množství vodního porostu, například v USA a na Novém Zélandě (Flajšhans a kol., 2008). Další výhodou triploidních ryb je rychlejší růst.

U diploidních jedinců je energie v době dospívání použita pro vývoj pohlavních orgánů, zatímco u triploidů pro jejich celkový růst (Rottmann a kol., 1991; Flajšhans a kol., 2010). V období pohlavního dospívání jsou také u triploidů výrazně ovlivněny organoleptické vlastnosti masa. Například u pstruha duhového byl u polyploidních jedinců popsán nižší obsah vody v mase a vyšší obsah tuku ve svalovině (Lincoln, 1987). Buchtová a kol. (2005) se v souvislosti s organoleptickými vlastnostmi masa zabývala chemickým složením masa u triploidních línů obecných *Tinca tinca* a dospěla k názoru, že triploidní líni mají vyšší obsah tuku ve svalovině a lepší chemické složení masa než diploidní jedinci.

### **3. Materiál a metodika**

Experimentální část byla prováděna v rámci pilotního projektu Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s.r.o. z programu OP Rybářství č.CZ.1.25/3.4.00/11.00374 „Ověření technologie hromadné indukce triploidie u sivena amerického v provozních podmínkách“. Celý proces probíhal v provozních podmínkách firmy. Laboratorní analýzy byly provedeny v laboratoři VÚRH FROV JU ve Vodňanech.

Experiment byl rozdělen do několika fází. V první fázi se jednalo o přípravu a výběr generačních ryb, v druhé fázi byl proveden výtěr a oplození jiker, třetí fáze byla zaměřena na indukci triploidie pomocí fyzikálních šoků (teplého a tlakového), ve čtvrté fázi proběhla inkubace jikera v poslední páté fázi byla ověřována účinnost triploidie na rozplavaném plůdku.

#### **3.1. Charakteristika generačních ryb**

Měli jsme k dispozici 135 ks generačních ryb sivena amerického *Salvelinus fontinalis*, z toho 50 samic (jikernaček) a 85 samců (mlíčáků). Generační ryby byly ve věku 3-4 let a jejich průměrná hmotnost se pohybovala mezi 500-1000g.

Do předvýtěrového období byly ryby umístěny na žlabech v areálu pstruhařství. Následně byly sloveny a přemístěny do předem vydezinfikovaných manipulačních nádrží v rybí líhni. Zde se provádělo třídění generačních ryb dle pohlaví, aby nedocházelo ke spontánnímu výtěru a několik dní byla v pravidelných intervalech kontrolována zralost pohlavních produktů a připravenost ryb k umělému výtěru. Pozornost byla věnována především jikernačkám, u kterých v době připravenosti na výtěr, docházelo k samovolnému uvolňování jiker z dutiny břišní již při mírném tlaku na břišní partie. Hormonální stimulace ryb nebyla provedena.

## 3.2. Umělý výtěr a oplození jiker

Bezprostředně před samotným výtěrem se prováděla anestezie generačních ryb ve vodní lázni. Lázeň byla připravena ve vaničce o objemu 50 litrů, do které byl přidán hřebíčkový olej v koncentraci  $0,03 \text{ ml.l}^{-1}$ . Generační ryby se nechaly v připravené vodní lázni až do doby ztráty reflexů. Následně se přistoupilo k umělému výtěru.

Nejdříve se vytíraly jikernačky, které se po vyjmutí z anestezie otřely vlhkým hadrem, aby se zamezilo kontaktu pohlavních produktů s vodou. Jikry s ovariální tekutinou byly uvolňovány mírným masírováním dutiny břišní do předem připravené a pečlivě vysušené plastové misky. U samců se postupovalo stejným způsobem, mlíčí bylo odebíráno do předem vysušených plastových kádinek. Kádinky a misky se předem zvážily, aby mohly být následně zjištěny hmotnosti čistých pohlavních produktů.

Oplození bylo provedeno suchou německou metodou, kdy se nejdříve smíchají jikry (i s ovariální tekutinou) s mlíčím a poté se přidá voda, nebo aktivací roztok, pro aktivaci pohlavních produktů. Ke směsi jiker z několika samic bylo přidáno mlíčí samců (heterospermické oplození), v poměru 3 ml heterospermatu na 100 ml jiker. Po osemenění proběhla aktivace pohlavních produktů vodou z líhně o teplotě  $10^{\circ}\text{C}$ , poměr vody a oplozených jiker byl 2:1. Voda byla temperována na  $10^{\circ}\text{C}$  teplotu 2kW závěsnými termostaty (Julabo GmbH, Německo). Čas, kdy došlo k oplození gamet byl označen jako čas 0 minut

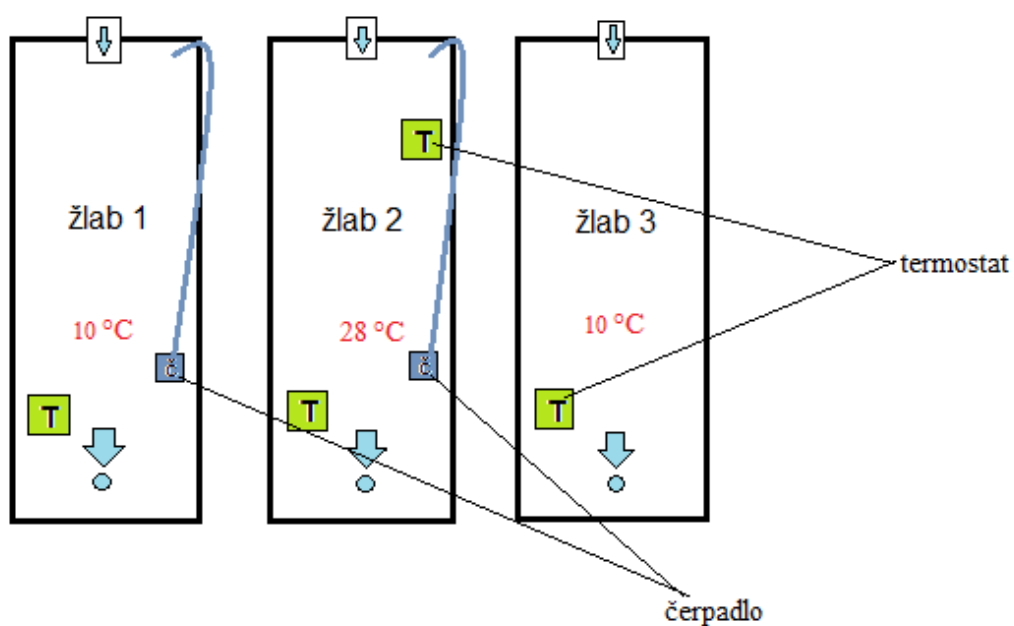
Oplozené jikry byly uchovávány při teplotě  $10^{\circ}\text{C}$  a po 1,5 minutě od času 0 minut, bylo započato postupné promývání jiker vodou o stejné teplotě, aby se eliminovala jejich lepkavost a odstranily se veškeré zbytky spermatu. Po důsledném propláchnutí jiker se přistoupilo k indukci triploidie.

### 3.3. Indukce triploidie

#### 3.3.1. Technologické sestavy pro indukci triploidie

Technologické sestavy, které se použily pro realizaci celého experimentu, byly připraveny ještě před výtěrem. Obsahovaly tři odkulovací žlaby, do kterých byly přeneseny vložky s jikrami. V každém ze dvou žlabů, ve kterých se provádělo temperování vody na 10 °C, byl zavěšen 2 kW termostat (Julabo, GmbH, Německo) a jeden žlab ještě navíc obsahoval čerpadlo o výkonu 700 l.h-1 s hadicovým rozvodem. Třetí odkulovací žlab, ve kterém byla indukována triploidie teplým šokem, obsahoval dva 2 kW závěsné termostaty, aby mohla být teplota vody zvýšena na 28 °C, a čerpadlo pro cirkulaci vody (Obr. č. 3).

Pro indukci tlakového šoku byla použita tlaková jednotka, která se skládala z vysokotlakého kompresoru s pojistným ventilem, kterým byl stlačený vzduch dodáván pomocí vysokotlaké hadice a redukčního ventilu do násobiče, díky kterému došlo k vytvoření požadovaného tlaku uvnitř tlakové nádoby. Celá tlaková jednotka byla registrována Úřadem průmyslového vlastnictví ČR jako užitný vzor č. 23378 (Flajšhans a kol., 2012).



Obr. č. 3: Schéma odchovných žlabů pro inkubaci jiker na Pstruhařství Kaplice spol. s r.o.

### **3.3.2. Indukce triploidie teplým šokem**

Jikry, pro indukci teplým šokem a jikry, které sloužily jako kontrolní skupina byly přeneseny na vložky do žlabů se stálou teplotou 10 °C .

Po 15 minutách od oplození se vložky s jikrami pro indukci teplým šokem přenesly do žlabu, ve kterém byla teplota vody zvýšena termostatem na 28 °C a zde se ponechaly po dobu 10 minut. Poté byly vložky z teplé lázně vyjmuty a přeneseny do odkulovacích žlabů se stálou teplotou 10°C , kde se jikry inkubovaly až do vykulení .

### **3.3.3. Indukce triploidie tlakovým šokem**

Jikry, které sloužily pro indukci triploidie tlakovým šokem, byly po 17 minutách od aktivace gamet nality společně s vodou o teplotě 10 °C do tlakové nádoby, ve které se teplota vody pohybovala též na 10 °C. Postupně byl v tlakové nádobě vyvoláván tlak až na hodnotu 65,6 MPa. Šok trval 5 minut (expoziční doba šoku), po ukončení šoku byl vypuštěn přebytečný tlak z nádoby a jikry byly společně s vodou přemístěny na vložky a následně přeneseny do odkulovacích žlabů s teplotou 10 °C , zde se ponechaly až do vykulení.

## **3.4. Inkubace jiker**

Inkubace oplozených jiker probíhala na vložkách ve žlabu. Jikry na vložkách byly rozloženy v jedné, maximálně ve dvou vrstvách z důvodu lepší kontroly, snazšího odebírání odumřelých jiker a správného promývání jiker čerstvou, okysličenou vodou. Během celé inkubace bylo o jikry pečováno. Pravidelně byla sledována teplota a kvalita vody, odstraňovaly se odumřelé a zaplísňené jikry, aby nedocházelo k organickému znečištění vody a k dalšímu sekundárnímu zaplísnění ostatních jiker. Přesný počet odstraněných jiker se pečlivě zaznamenával. Při inkubaci nebyly aplikovány žádné protiplísňové koupele.



### 3.5. Ověřování triploidie

Triploidie se ověřovala u rozplavaného plůdku ve stáří 200 d° po vykulení. Ověřování proběhlo v Laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky FROV JU, kam byl plůdek převezen v polyetylenových vacích s kyslíkovou atmosférou. V laboratoři se přistoupilo k přípravě vzorků pro analýzu na průtokové cytometrii, následujícím způsobem.

Plůdek byl usmrcen předávkováním CO<sub>2</sub>. Poté byl individuálně přenesen na hodinové sklíčko, přední část odříznuta za žlutkovým váčkem a odpreparovaná ocasní část byla opláchnuta fyziologickým roztokem.

Tkáň byla rozstříhána nůžkami na menší kousky a poté bylo přidáno 0,5 ml fyziologického roztoku a pokračovalo se v rozstříhávání tkáně, aby se buňky dostaly do připravovaného preparátu. Mikropipetou bylo přidáno 200 µl DAPI Solution A (Partec GmbH, Německo), ve kterém se buňky začaly lyzovat, nůžkami byly ještě tkáně krátce rozmělněny a následně se nechaly buňky 10 minut uvolňovat.

Po deseti minutách byla čistou Pasteurovou pipetou odsáta tekutina s lyzovanými a uvolněnými buňkami, která byla překapána přes filtr do 3,5 ml zkumavky pro flow cytometrii.

Mikropipetou bylo přidáno 1000 µl roztoku DAPI SOLUTION B. Zkumavka byla uzavřena plastovým uzávěrem a krátce roztřepána na třepačce a nechala se 10 minut odstát.

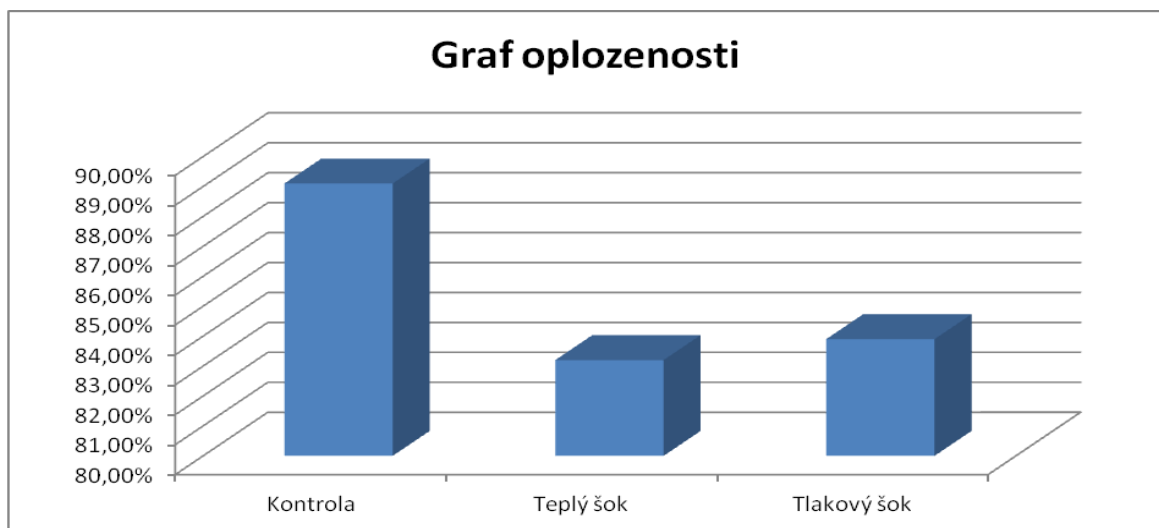
Připravené vzorky se analyzovaly na relativní obsah DNA průtokovým cytometrem Partec CCA I ((Partec GmbH, Německo). Vzorky z normálního oplození (bez použití šoku) sloužily jako diploidní kontrola.

## 4. Výsledky

V této kapitole jsou rozděleny výsledné hodnoty celého experimentu (oplozenost jiker, líhivost, ověřování účinnosti a porovnání teplého a tlakového šoku a jejich zhodnocení).

### 4.1. Oplozenost jiker

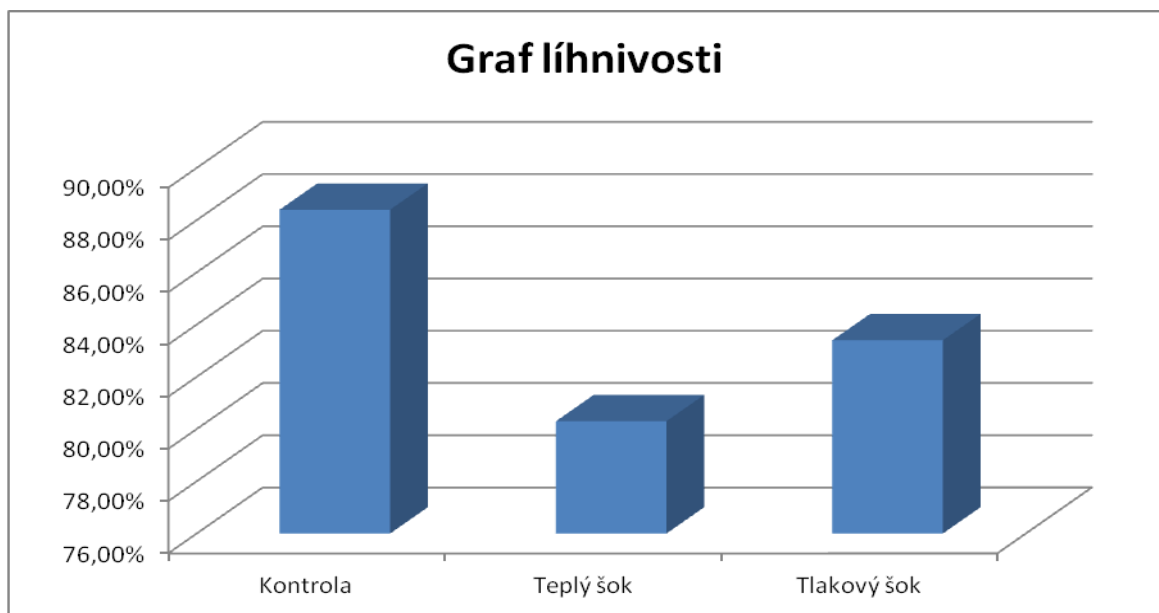
Oplozenost jiker v kontrole (jikry diploidního sivena amerického inkubované bez šoku) byla 89,1 %, tato hodnota je nadprůměrná a vypovídá o správném postupu při umělém výtěru. Oplozenost jiker sivena amerického po teplém šoku k indukci triploidie byla 83,2 % a po tlakovém šoku k indukci triploidie 83,9 % (Graf č. 1). Hodnota oplozenosti jiker po teplém šoku dosahovala 90% kontroly a po tlakovém 94,2 % kontroly.



Graf č. 1: Porovnání % oplozenosti jiker mezi jednotlivými šoky a kontrolou.

## 4.2. Líhivost

Líhivost jiker v kontrole (jikry diploidního sivena amerického inkubované bez šoku) byla na úrovni 88,4 %. Tato hodnota je nadprůměrná a vypovídá o správném postupu během celé inkubace. Při inkubaci jiker po teplém šoku byla zjištěna líhivost na úrovni 80,3 %. Líhivost u jiker po tlakovém šoku byla vyšší oproti šoku teplému a pohybovala se na úrovni 83,4 % (Graf č. 2). Z celkem 9 500 jiker podrobených teplému šoku bylo získáno 7 630 ks plůdku sivena a z celkem 29 100 jiker podrobených tlakovému šoku bylo získáno 24 260 ks plůdku sivena (Tab.č. 1).



Graf č.2 : Porovnání % líhivosti jiker mezi jednotlivými šoky a kontrolou.

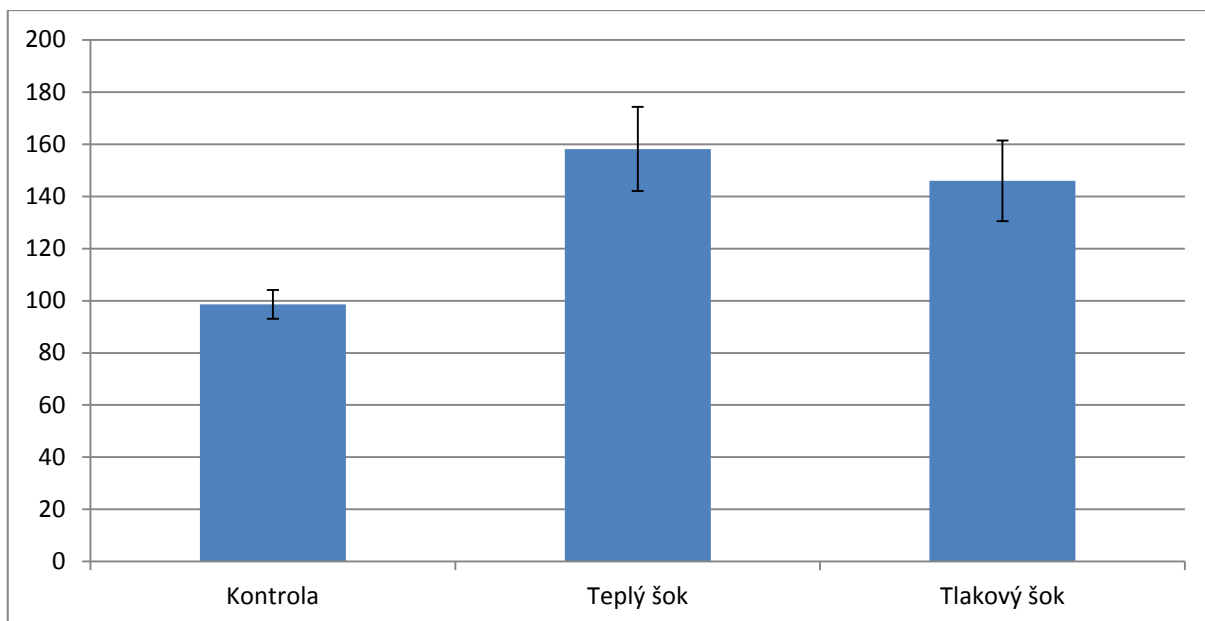
### **4.3. Výsledek ověřování účinnosti triploidie u teplého a tlakového šoku**

Ověřování účinnosti obou typů šoku k indukci triploidie u plůdku sivena amerického bylo provedeno na základě metody průtokové cytometrie. U 21 kusů plůdku z kontrolní skupiny byl zjištěn relativní obsah DNA na kanále  $98,59 \pm 5,56$  (průměr  $\pm$  S.D.) s variačním koeficientem (CV)  $3,91 \pm 1,04$ . Všech 21 kusů plůdku bylo diploidních.

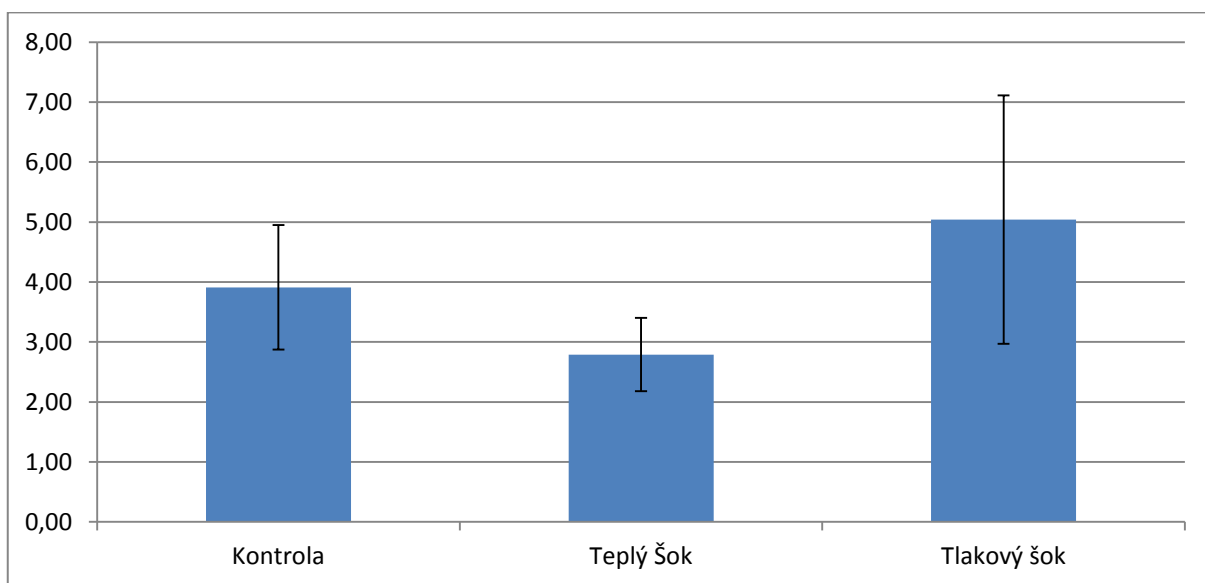
U 30 kusů plůdku z varianty s indukcí triploidie teplým šokem byl u triploidů (24 ks ze 30) zjištěn relativní obsah DNA na kanále  $158,16 \pm 16,16$  s variačním koeficientem  $2,79 \pm 0,61$ . U zbylých ryb byl relativní obsah DNA na kanále  $107,75 \pm 3,62$  s variačním koeficientem  $3,95 \pm 0,39$ , jednalo se tedy o diploidy. Triploidie byla úspěšně indukována u 80 % plůdku.

U 30 kusů plůdku z varianty s indukcí triploidie tlakovým šokem byl zjištěn relativní obsah DNA na kanále  $146,01 \pm 15,46$  s variačním koeficientem  $5,04 \pm 2,07$ . Všech 30 ks bylo triploidních. Triploidie byla tedy úspěšně indukována u 100% analyzovaného plůdku.

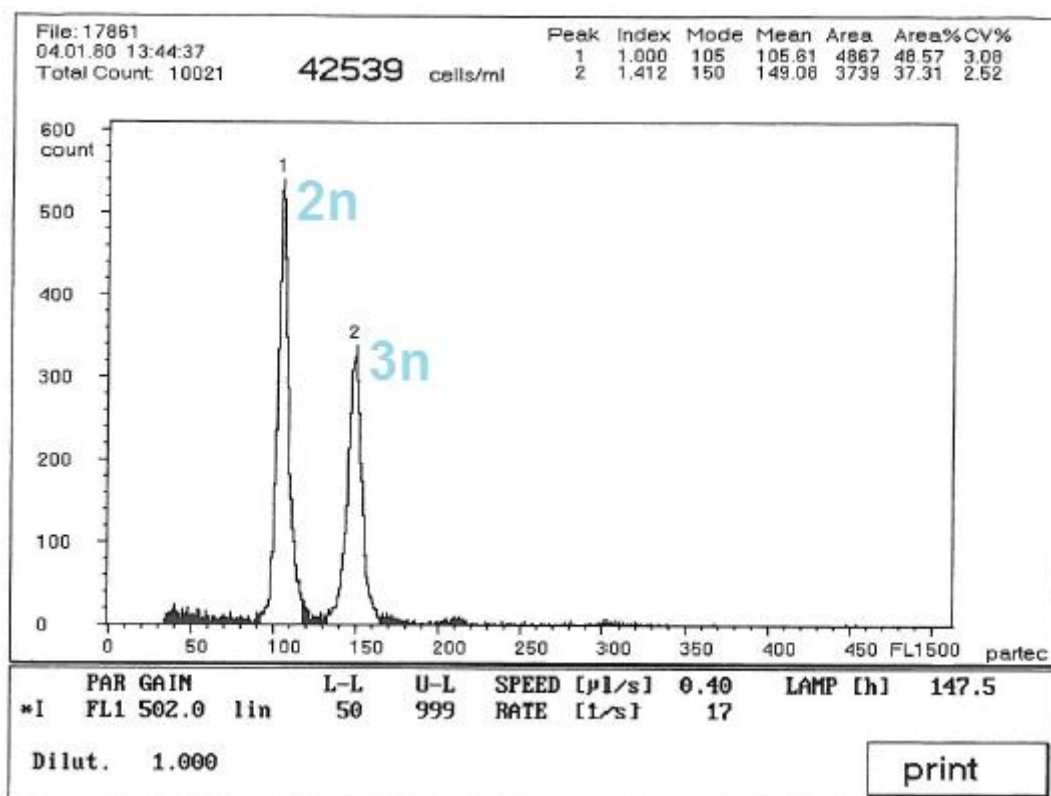
Porovnání relativního obsahu DNA je uvedeno v Grafu č. 3. Porovnání variačního koeficientu je uvedeno v Grafu č. 4. A porovnání vzorků diploidního a triploidního plůdku sivena jsou znázorněny na obrázku z histogramu průtokové cytometrie (Obr. č. 4).



Graf č. 3 : Porovnání relativního obsahu DNA (průměr ± S.D.) u tří skupin vzorků (kontrola, teplý a tlakový šok).

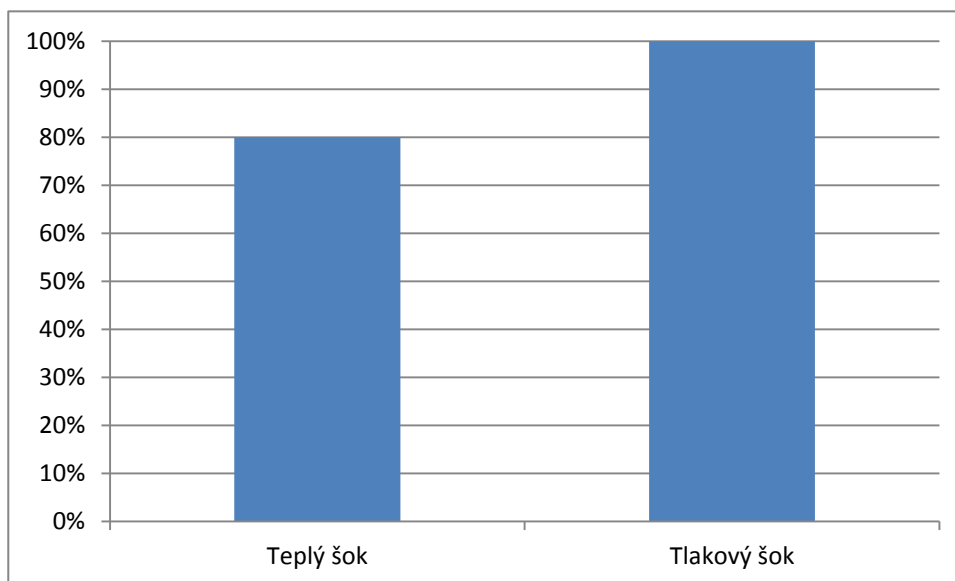


Graf č.4: Porovnání variačního koeficientu hodnot relativního obsahu DNA u tří skupin vzorků (kontrola, teplý a tlakový šok).



Obr. č. 4: Histogram smíšeného vzorku buněk diploidního a triploidního plůdku sivena z průtokové cytometrie (Partec CCA I). Relativní obsah DNA diploidního (2n) sivena je na kanále 100, relativní obsah DNA triploidního (3n) sivena je na kanále 150.

U indukce teplým šokem byla zjištěna účinnost 80 %, tedy ze 7 630 ks plůdku sivena byla triploidizace úspěšná u 6 104 ks. U indukce tlakovým šokem byla zjištěna 100 % indukce triploidie, tedy všech 24 260 ks plůdku bylo triploidních (Tab. č. 1). Účinnost triploidizace je znázorněna na Grafu č. 5.



Graf č.5: Porovnání účinnosti triploidizace u obou typů šoků.

#### 4.4. Porovnání a zhodnocení teplého a tlakového šoku

Tlakový šok se ukázal jako výhodnější a to především z hlediska účinnosti triploidizace, oplozenosti jiker a líhnivosti plůdku oproti výše zmíněnému teplému šoku, který je však jednodušší na provoz, méně finančně nákladný, protože pro jeho aplikaci není potřeba tlaková jednotka. Přehled všech zjištěných hodnot je uveden v Tab. č. 1.

Tab. č. 1: Přehled zjištěných hodnot oplozenosti, líhnivosti a účinnosti šoku.

	Kontrola	Teplý šok	Tlakový šok
<b>Oplozenost jiker</b>	89,10%	83,20%	83,90%
<b>Líhnivost jiker</b>	88,40%	80,30%	83,40%
<b>Účinnost triploidizace</b>		80%	100%

## 5. Diskuze

### 5.1. Oplozenost a líhnivost jiker

Generační siveni byli ve věku 3-4 let, což je ideální věk z hlediska výtěrových charakteristik (Příhoda a Komínek, 1977). A to především v souvislosti s inkubací a líhnivostí, protože u mladších generačních ryb byly zjištěny velké ztráty plůdku, a to 80-100 % (Příhoda a Komínek, 1977). Ryby byly v dobré kondici, před výtěrem byly chovány v zemních rybnících v areálu pstruhařství. Generační siveni nebyli hormonálně stimulováni. Výtěr probíhal klasickou německou metodou (Kouřil a kol., 2008), na rozdíl od metody ruské, která se používá například při výtěru sivena amerického na pstruhařství Žichovice (Senft, úst. sděl., 2013), je tato metoda jednodušší a méně časově náročná. Jako aktivační roztok pro oplozené jikry se použila voda z líhně o teplotě 10 C°. Při použití aktivačních roztoků solí nebo organických sloučenin by se mohla ještě částečně oplozenost zvýšit vlivem prodlouženého pohybu spermií (Kouřil a kol., 2008).

Oplozenost u kontroly, u teplého a tlakového šoku byla vysoká, dobrému výsledku napomohl správný postup jak při umělém výtěru, tak při samotné indukci triploidie. Při podobném postupu umělého výtěru sivena a jiných příbuzných ryb se stejnými, nebo podobnými výtěrovými charakteristikami by se mělo postupovat stejně a teplota oplozovacího roztoku by se neměla lišit. Po oplození byly jikry inkubovány na vložkách s teplotou vody 10 C°. Tato teplota je standardní pro inkubaci jiker lososovitých ryb, při příliš nízkých teplotách by se prodloužila doba inkubace a tím by se mohla zvýšit úmrtnost jiker. Při použití vyšší teploty by se inkubační doba zkrátila, ale výsledná líhnivost by byla nižší (Kouřil a kol., 2008).

Líhnivost jiker v kontrole (jikry diploidního sivena amerického inkubované bez šoku) byla vysoká. U obou šoků byla zjištěna líhnivost nad 80 %, což je pouze o <8 % menší líhnivost než v kontrole. U jiker indukovaných tlakovým šokem byla vyšší líhnivost o 3,1 %, tento výsledek potvrzuje vyšší líhnivost plůdku triploidů lososovitých ryb indukovaných tlakovým šokem oproti teplému šoku (Haffray a kol., 2007).



## 5.2. Účinnost tlakového šoku

V provozním měřítku se u sivena amerického osvědčila hodnota tlakového šoku od 50 MPa (Boulanger, 1991) do 65 MPa (Deeley a Benfey, 1995). Náš experiment indukce triploidie tlakovým šokem byl započat 17 minut po oplození a hodnota tlaku byla 65,6 MPa po dobu 5 minut. Tyto hodnoty jsou v rozmezí hodnot pro indukci triploidie u lososovitých ryb, které uvádí Piferrer a kol. (2009): začátek šoku 15-20 minut po oplození, intenzita 58-85 MPa a doba expozice 6 minut. Těmito proměnnými bylo indukováno 100 % triploidů. Tento výsledek je výborný a hovoří o správném postupu během celého experimentu. Janček (2000) uvádí, že je důležité dbát na dobu aplikace šoku, příliš brzký, nebo naopak příliš pozdní šok může zcela zásadně ovlivnit indukci. Optimální hodnoty pro použití tlakového šoku u sivena, kdy byla provedena 100 % indukce triploidie, uvádí Arai a kol. (1989) při aplikaci šoku 10 minut po oplození po dobu 6 minut a intenzitě tlaku 68,6 MPa. Při stejné intenzitě tlaku po dobu 7 minut a začátku šoku 12 minut po oplození byla zjištěna 90 % indukce triploidie (Arai a kol., 1989). Janček (2000) uvádí, že aplikace tlakového šoku 30 minut po oplození snižuje výsledek účinnosti indukce triploidie. V porovnání s jinými lososovitými rybami, kdy například McGeachy a kol. (1995) uvádí 85-88 % účinnost při triploidizaci tlakovým šokem u lososa obecného *Salmo salar* při tlaku 65,5 MPa po dobu 5 minut se začátkem šoku 30 minut po oplození jiker.

## 5.3. Účinnost teplého šoku

Ověřování technologie teplého šoku pro indukci triploidie sivena proběhlo 15 minut po oplození v lázni o teplotě vody 28 C° po dobu 10 minut. Aplikací teplého šoku jsme dosáhli 80 % indukce triploidie, tato indukce je v celku úspěšná. Podobných výsledků dosáhl i Janček (2000) při délce šoku 10 minut o teplotě vody 28-29 C°. 100 % indukci uvádí Scheerer a Thorgaard (1983) při podobných parametrech, jaké uvádí Janček (2000). Arai a kol. (1989) uvádí na základě svého experimentu, že největší účinnost indukce triploidie teplým šokem u sivena (80 %) byla získána při aplikaci šoku 10-20 minut po oplození, tito triploidi měli však nízkou líhivost (0-31 %). Nejlepší výsledky, poměru líhivosti a účinnosti indukce byly při aplikaci šoku 30 minut po oplození, kdy účinnost indukce byla 70 % a líhivost 79 %, teplý šok započatý po 45

minut od oplození měl nejhorší výsledky indukce (Arai a kol., 1989). Dubé a kol. (1991) uvádí nejlepší výsledky pro indukci triploidie u sivena při aplikaci šoku 15 minut po oplození o teplotě vody 28 C° a délkou expozice 10 minut, při těchto hodnotách dosáhl Dubé a kol. (1991) 100 % účinnosti indukce s 42 % přežitím, takže náš experiment potvrdil jejich výsledky.

Úspěšnost teplého šoku u sivena je pravděpodobně vyšší, než u indukce šokem chladovým (Tiwary a kol., 2004).

Pro ostatní losovité ryby uvádí Piferrer a kol. (2009) dobu aplikace šoku 15-20 minut po oplození o teplotě vody 34-41 C°. U pstruha potočního byla zjištěna 100 % indukce triploidie 15 minut po oplození při teplotě vody 28 C° po dobu 10 minut (Scheerer a Thorgaard, 1983).

Účinnost teplého šoku může být podle Jungalwalla (1991) velmi variabilní a pro celkové posouzení indukce by bylo nutné více opakování. Také přežití vylíhlého plůdku, podle některých autorů, může být velmi nízké a to zejména u raných stádií (Sütterlin a kol., 1987). Záleží také na kvalitě jiker a citlivosti jiker daného druhu (Flajšhans, 1989).

## **5.4. Porovnání a zhodnocení teplého a tlakového šoku**

U obou šoků šlo pouze o ověření dříve úspěšné indukce triploidie v laboratorním měřítku, nešlo tedy o sérii experimentů zaměřenou na nalezení ideální kombinace proměnných veličin tlakového a teplého šoku.

Podle Lincolna (1989) se při tlakovém šoku dosáhne lepší úspěšnosti indukce triploidie u lososovitých ryb než je tomu u šoku teplého. Výsledky tuto teorii potvrdily a tlakový šok se ukázal jako výhodnější a to především z hlediska účinnosti triploidizace, oplozenosti jiker a líhivosti plůdku oproti výše zmíněnému teplému šoku, který je však jednodušší na provoz, méně finančně nákladný, protože pro jeho aplikaci není potřeba tlaková jednotka. Cena tlakové jednotky se pohybuje mezi 400 000- 500 000 Kč (Flajšhans, úst. sděl., 2014).

## 6. Závěr

Cílem této práce byla indukce triploidie u sivena amerického *Salvelinus fontinalis* v provozních podmínkách rybí líhně na Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s.r.o. za pomoci tlakového a teplého šoku a následné vyhodnocení výsledků.

Práce byla vykonávána v rámci pilotního projektu z programu OP Rybářství č.CZ.1.25/3.4.00/11.00374 „Ověření technologie hromadné indukce triploidie u sivena amerického v provozních podmínkách“. Teplý šok spočíval v přenesení jiker do lázně s vodou o teplotě 28°C, což je teplota o 18°C vyšší, než je přirozená teplota inkubace jiker u sivena amerického, a zde byly jikry ponechány po dobu 10 minut. Indukce triploidie tlakovým šokem byla provedena pomocí tlakové jednotky, která byla registrována Úřadem průmyslového vlastnictví ČR jako užitný vzor č. 23378. Jikry byly v tlakové nádobě vystaveny tlaku o síle 65,6 MPa.

Získané výsledky potvrdily možnost triploidizace sivena amerického v provozních podmínkách pomocí tlakového a teplého šoku. Hromadná triploidizace tlakovým šokem byla v České republice u sivena amerického prováděna poprvé, přičemž se ukázalo, že tlakový šok je pro praxi výhodnější a to především z hlediska vyšší oplozenosti jiker, vyšší líhivosti, ale hlavně tlakovým šokem bylo dosaženo 100% triploidizace u sivena amerického. Oproti tomu teplý šok se ukázal jako méně účinný, protože indukoval pouze 80% triploidních jedinců, stejně tak oplozenost jiker a líhivost byla nižší, než tomu bylo u tlakového šoku. Bylo možné konstatovat, že při dodržení stanovených parametrů je šok hydrostatickým tlakem s relativně krátkou expoziční dobou šetrnější k oplozeným jikrám a účinnější v indukci u triploidie sivena amerického než provozně jednodušší teplý šok.

Z výsledků vyplývá, že především tlakový šok, přesněji šok náhlou změnou hydrostatického tlaku, by mohl být v praxi využíván k hromadné indukci triploidního sivena amerického a pro moderní akvakulturu v České republice, ale i ve světě by mohla být tato metoda velkým přínosem. Neboť triploidní ryby všeobecně vykazují vyšší růstové schopnosti, sníženou agresivitu, reprodukční sterilitu či substerilitu, a lepší organoleptické vlastnosti masa.

## 7. Seznam použité literatury

### Literární zdroje:

- Al-Sabti, K. (1995). Detection of triploidy in fish using the cytokinesis-blocked method for erythrocyte and hepatic cells. *Cytobios* 82, 181–187.
- Allen, S.K. (1983). Flow cytometry: assaying experimental polyploidy in fish shellfish. *Aquaculture* 33, 317–328.
- Allendorf, F.W., Thorgaard, G.H. (1984). Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Turner, B.J. (Ed.), *Evolutionary Genetics of Fishes*. Plenum Press, New York, 1–53.
- Arai, K., Fujino, K., M. Kahamura. (1989). Chromosome set manipulations in *Salvelinus* species. *Physiol. Ecol. Japan*, 515–528.
- Auger, D. L., Gray, A. D., Ream, T. S., Kato, A., Coe, E. H., Birchler, J. A. (2005). Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics*, 169(1), 389–397.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E. (1991). Ploidy manipulation in molluscan shellfish, a review. *J. Shellfish Res.* 10, 1–18.
- Benfey, T.J. (1989). A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1682, 33s.
- Benfey, T.J. (1999). The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7, 39–67.
- Benfey, T.J. (2001). Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *ICES J. Mar. Sci.* 58, 525–529.
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M. (1984). Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 36, 359–367.
- Benfey, T.J., Solar, I.I., de Jong, G., Donaldson, E.M. (1986). Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *T. Am. Fish. Soc.* 115, 838–840.
- Boulanger, Y. (1991). Performance comparison of all-female diploid and triploid brook trout. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science 1789, 111–121.
- 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 J. Anim. Sci.* 50, 213–219.

- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev., Genet.* 6, 836–846.
- Cassani, J.R., Caton, W.E., Clark, B. (1984). Morphological comparison of diploid and triploid hybrid grass carp, *Ctenopharyngodon idella* female x *Hypophthalmichthys nobilis* male. *J. Fish Biol.* 25, 269–278.
- Deeley, M. A., Benfey, T. J. (1995). Learning ability of triploid brook trout. *Journal of Fish Biology* 46, 905–907.
- Dubé, P., Blanc, J-M., Chouinard, M., Noue, J., 1991. Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 92, 305-311.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J., Piferrer, F. (1997). Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 152, 287–298.
- Flajšhans, M. (1989). Umělá polyploidizace u lososovitých ryb (Přehled). *Bull. VURH Vodňany* 2, 14–17.
- Flajšhans, M., Vajcová, V. (2000). Odd ploidy levels in sturgeon suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionary tetraploid and/or octaploid parental species. *Folia Zool.* 49, 133–138.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O. (2008). Genetika a šlechtění ryb. *VÚRH JU Vodňany*, 230s.
- 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., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L. (2012). Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. *Užitný vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.*
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Šlechtová, V.B., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O. (2013). Genetika a šlechtění ryb. *FROV JU, Vodňany*, 305s.
- Haffray, P., Aubin, J., Houis, V., Labbe, L., Jalabert, B. (2007). Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yields and malformations up to swim up stage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 272, 265s.
- Hussain, M.G., Chatterji, A., McAndrew, B.J., Johnstone, R. (1991). Triploidy induction in Niletilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theor. Appl. Genet.* 81, 6–12.

- Cherfas, N.B., Ilyasova, V.A. (1980). Induced gynogenesis in silver crucian carp and carp hybrids. *Genetika* 16, 1260–1269.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P. (1986). Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72, 193–206.
- Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B. (1990). Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *T. Am. Fish. Soc.* 119, 698–717.
- Janček, J. (2000). Produkčné zhodnotenie triploidizácie sivoňa amerického (*Salvelinus fontinalis*, M.) v podmienkach pstruhárstva Biely Potok. Diplomová práca MZLU Brno, 82 s.
- Jungalwalla, P.J. (1991). Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1789, 47–71.
- Johnstone, R., Knott, R.M., McDonald, A.G., Walsingham, M.V. (1989). Triploidy induction in recently fertilized Atlantic salmon ova using anaesthetics. *Aquaculture* 78, 229–236.
- Kouřil, J., Mareš, J., Pokorný, J., Adámek, Z., Randák, T., Kolářová, J., Palíková, M. (2008). Chov lososovitých druhů ryb, lipana a síhů. *VÚRH JU Vodňany*, 141s.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W., Knudsen, K.L., Thorgaard, G.H. (1985). Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. *Heredity* 54, 219–225.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K. (2003). Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 237–246.
- Linhart, O., Flajshans, M. (1995). Triploidization of European catfish *Silurus glanis* L. by heat shock. *Aquacult. Res.* 26, 367–370.
- 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.). *Aquac. Int.* 14, 9–25.
- Lincoln, R.F. (1987). Triploid rainbow trout. *Trout News (MAFF Lowestoft)* 1, 13–16.
- Lincoln, R.F., Scott, A.P. (1983). Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture* 30, 375–380.
- Lincoln, R. F. (1989). Triploid induction in rainbow trout using hydrostatic pressure. *Trout News* 8, 8–10.

- Liu, S., Sezaki, D., Hashimoto, K., Kobayashi, H., Nakamura, M. (1978). Simplified techniques for determination of polyploidy in ginbuna, *Carassius auratus langsdorfi*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44, 601–606.
- Lou, Y.D., Purdom, C.E. (1984). Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 25, 345–351.
- McKay, L.R., Ihssen, P.E., McMillan, I. (1992). Growth and mortality of diploid and triploid tiger trout (*Salmo trutta* x *Salvelinus fontinalis*). Aquaculture 106, 3-4, 239–251
- McGeachy, S., Benfey, T. J., Friars, G. W. (1995). Freshwater performance of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) in New Brunswick aquaculture. Aquaculture 137, 333–341.
- Nagoya, H., Kimoto, T., Onozato, H. (1990). Diploid gynogenesis induced by suppression of the second or the third cleavage in the goldfish, *Carassius auratus*. Bull. nat. Res. Inst. Aquaculture 18, 1–6.
- Okada, H. (1985). Studies on the artificial sex control in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery 40, 1–49.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R. (1998). Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia 384, 167–243.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P. (2000). Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. Aquaculture 188, 79–90.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, C., Martínez, P. (2003). Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*), II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. Aquaculture 220, 821–831.
- 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.
- Příhoda, J., Komínek, A. (1977). K problematice zvýšených ztrát jiker a embryí během inkubace u sivena amerického v podmínkách líhně. Bull. VÚRH Vodňany, 4, 22–25.
- Purdom, C.E. (1983). Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture 33, 287–300.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L. (2006). Cytogenetics as a tool box in fish conservation: the present situation in Europe. In Pisano, E., Ozouf- Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, pp. 215–241.

- Ramsey, J., Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu.Rev. Ecol. Syst.*29, 467–501.
- Refstie, T., Vaasvic, V., Gjedrem, T. (1977). Induction of polyploidy in salmonids by Cytochalasin B. *Aquaculture* 10,65–74.
- Rottmann, R. W., Shireman, J. V., Chapman, F. A. (1991). Introduction to hormone-induced spawning of fish. Southern Regional Aquaculture Center 421.
- Sheehan, R.J., Shasteen, S.P., Suresh, A., Kapuscinski, A.R., Seeb, J.E. (1999). Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 128, 491–498.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H. (1983). Increased survival in salmonids hybrids by induced triploidy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2040–2044.
- Small, S.A., Benfey, T.J. (1987). Cell size in triploid salmon. *J. Exp. Zool.* 241, 339–342.
- Smith, L.T., Lemoine, H.L. (1979). Colchicine-induced polyploidy in brook trout. *Prog. Fish-Cult.* 41, 86–88.
- Solomon, D.J. (2003). The potential for restocking using all-female triploid brown trout to avoid genetic impact upon native stocks. *Trouth news*, 28–30.
- Sütterlin, A.M., Holder, J., Benfey, T.J. (1987). Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in Landlocked anadromous and hybrid (landlocked X anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 64, 157–164.
- Sugama, K., Taniguchi, N., Seki, S. (1992). Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck a Schlegel): use of allozyme marker for ploidy and family identification. *Aquacult. Fish. Mgmt.* 23, 149–159.
- Tambets, J., Paaver, T., Palm, A., Pihlak, A. Gross, R. (1991). Variability of some cell parameters in di- and triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* R. *Eesti Teaduste Akadeemia Toimetised Bioloogia* 40, 129–135.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K. (1997). Induction of triploidy by cold shock in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Asian Fish. Sci.* 10, 123–129.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K. (1999). Altered body shape as a morphometric indicator of triploidy in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture Research* 30, 907–910.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K. (2004). The biology of triploid fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14, 391–402.
- Thorgaard, G.H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.H.,



- Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology, Vol. IXB. Academic Press, New York, pp. 405–434.
- Thorgaard, G.H., Gall, G.A.E. (1979). Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics* 93, 961–973.
- Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Zhang, J. (1992). Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies for fishes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, 251–256.
- Ueda, T., Sawada, M., Kobayashi, J. (1987). Cytogenetical characteristics of the embryos between diploid female and triploid male in rainbow-trout. *Jpn. J. Genet.* 62, 461–465.
- Ueda, T., Sato, R., Kobayashi, J. (1988). Triploid rainbow trout induced by high pH multiplied by high calcium. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 358s.
- Varadaraj, K., Pandian, T.J. (1988). Induction of triploids in *Oreochromis mossambicus* by thermal, hydrostatic pressure and chemical shocks. *Proc. Aquacult. Int. Congr. Vancouver, Canada*, 531–535.
- Wattendorf, R.J. (1986). Rapid identification of triploid grass carp with coulter counter and channelyzer. *Prog. Fish-Cult.* 48, 125–132.

## 8. Seznam obrázků, grafů, tabulek a příloh

### Obrázky:

Obr. č. 1 : Průběh indukce triploidie (upraveno podle Flajšhanse a kol., 2013)

Obr. č. 2 : Průběh indukce tetraploidie (upraveno podle Flajšhanse a kol., 2013)

Obr. č. 3 : Schéma odchovných žlabů pro inkubaci jiker na Pstruhařství Kaplice spol. s.r.o

Obr. č. 4: Histogram smíšeného vzorku buněk diploidního a triploidního plůdku sivena z průtokové cytometrie (Partec CCA I).

### Grafy:

Graf č. 1: Porovnání % oplozenosti jiker mezi jednotlivými šoky a kontrolou.

Graf č.2: Porovnání % líhnivosti jiker mezi jednotlivými šoky a kontrolou.

Graf č. 3 : Porovnání relativního obsahu DNA (průměr ± S.D.) u tří skupin vzorků (kontrola, teplý a tlakový šok).

Graf č.4 : Porovnání variačního koeficientu hodnot relativního obsahu DNA u tří skupin vzorků (kontrola, teplý a tlakový šok).

Graf č.5: Porovnání účinnosti triploidizace u obou typů šoků.

### Tabulky:

Tab. č.1 : Přehled zjištěných hodnot oplozenosti, líhnivosti a účinnosti šoku.

### Přílohy:

Příloha č. 1: Generační siven americký- samec (mlíčák)

Příloha č. 2 :Generační siven americký- samice (jikernačka)

Příloha č. 3 : Průběh umělého výtěru

Příloha č. 4 :Indukce triploidie tlakovým šokem-nalévání jiker s vodou do tlakové nádoby

Příloha č. 5 : Měření teploty vody u vložky s indukci teplého šoku  
Obr. č. 10: Rozplavaný plůdek sivena amerického ve stáří 200 d°

Příloha č. 6: Rozplavaný plůdek sivena amerického ve stáří 200 d°

Příloha č. 7 : Sestava pro přípravu vzorků pro ověřování triploidie

Příloha č. 8 : Sestava pro přípravu vzorků pro ověřování triploidie

Příloha č. 9 : Průtoková cytometrie Partec CCA I ((Partec GmbH, Německo)

## 9. Přílohy



Příloha č. 1 : Generační siven americký- samec (mlíčák) (Foto: autor).



Příloha č. 2 :Generační siven americký- samice (jikernačka) (Foto: autor).



Příloha č. 3 : Průběh umělého výtěru (Foto: autor).



Příloha č. 4 : Indukce triploidie tlakovým šokem-nalévání jiker s vodou do tlakové nádoby (Foto: autor).



Příloha č. 5 : Měření teploty vody u vložky s indukcí teplého šoku (Foto: autor).



Příloha č. 6: Rozplavaný plůdek sivena amerického ve stáří 200 d° (Foto: autor).





Příloha č. 7 a příloha č. 8: Sestava pro přípravu vzorků pro ověřování triploidie (Foto: autor).



Příloha č. 9 : Průtoková cytometrie Partec CCA I ((Partec GmbH, Německo) (Foto: autor).

## 10. Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá indukcí triploidie u sivena amerického *Salvelinus fontinalis* v provozních podmínkách pstruhařství za použití teplého a tlakového šoku.

První část práce zahrnuje problematiku polyploidie u ryb, její indukci, metody detekce polyploidie a její přínos pro akvakulturu.

Druhá část obsahuje technologický postup indukce triploidie a následné vyhodnocování účinnosti jednotlivých šoků stanovením ploidy plůdku průtokovou cytometrií.

Tímto experimentem bylo zjištěno, že teplý šok indukoval 80 % triploidních jedinců, oproti tomu šokem tlakovým byla indukce triploidie 100%.

Výsledkem bylo zjištění, že tlakový šok je pro indukci triploidie u sivenů amerických účinnější, než šok teplý a poskytuje lepší provozní výsledky. A to z důvodu lepší oplozenosti jiker, vyšší líhivosti, ale především vyššího procenta triploidních jedinců.

Klíčová slova: Triploidie, siven americký, tlakový šok, teplý šok, průtoková cytometrie.



## 11. Abstract

This bachelor thesis deals with the induction of triploidy in brook trout, *Salvelinus fontinalis* under farm conditions using a heat- and /or hydrostatic pressure shock.

The first part involves the issues of polyploidy in fish, its induction, detection methods of polyploidy and its contribution to aquaculture.

The second part deals with the technological process of induction of triploidy and subsequently, with evaluation of the effectiveness of both types of the shock upon ploidy level determine by flow cytometry.

In this experiment, heat shock induced 80% of triploids in contrary to the hydrostatic pressure shock inducing triploidy in 100%. The pressure shock induced triploidy in brook trout more effectively than the heat shock and provided better operational results. Moreover, pressure shock displayed better fertilization of eggs, higher hatchability, and also higher percentage of triploids.

Keywords: Triploidy, brook trout, pressure shock, heat shock, flow cytometry.