

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Studium reprodukční biologie u raků – páření, kladení  
a morfologická struktura samčích a samičích gamet**

**Autor:** Bc. Jan Kubec

**Vedoucí diplomové práce:** doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.

**Konzultant diplomové práce:** MSc. Hamid Niksirat Hashjin, Ph.D.

**Studijní program a obor:** Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** III.

České Budějovice, 2015

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. 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.

Datum:

Podpis:

## **Poděkování:**

Děkuji svému vedoucímu doc. Ing. Pavlu Kozákovi, Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady, cenné připomínky a trpělivost při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi MSc. Hamidu Niksirat Hashjinu, Ph.D. za odbornou pomoc při experimentech.

Experimenty v rámci mé diplomové práce byly realizovány s podporou grantového projektu Grantové agentury ČR: P505/12/0545 a P502/12/P177 a dotačního projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR CZ.1.05/2.1.00/01.0024.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2012/2013

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan KUBEC**  
Osobní číslo: **V12N005P**  
Studijní program: **N4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Studium reprodukční biologie u raků - páření, kladení a morfologická struktura samčích a samičích gamet**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

**Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :**

Cílem diplomové práce bude studium reprodukční biologie u raků se zaměřením na proces páření, interval mezi pářením a kladením vajíček, oplodnění a morfologickou strukturu samčích a samičích gamet.

V rámci diplomové práce bude vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku reprodukce u raků a dalších korýšů. Vlastní výzkumná práce bude zaměřena na bližší charakterizaci procesu páření a kladení u raků včetně vyhodnocení intervalu mezi pářením a kladením, popř. stanovení faktorů ovlivňující délku intervalu (druh, teplota). Další významnou součástí práce bude laboratorní studie morfologické struktury samčích a samičích gamet.

Tato práce bude finančně zajištěna projekty GAČR (P505/12/0545 a P502/12/P177) a MŠMT ČR (CZ.1.05/2.1.00/01.0024).

Rozsah grafických prací: **podle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **20 - 30 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Holdich, D. M., Lowery, R. S., 1988: *Freshwater Crayfish Biology, Management and Exploitation*. Chapman & Hall, London & Sydney, Timber Press, Portland, Oregon, 498 s.  
Holdich, D. M., 2002: *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, London, 702 s.  
Kozák, P., Polícar, T., Buřič, M., Kouba, A., 2009: Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR (2. přepracované vydání). Edice Metodik (technologická řada), FROV JU Vodňany, 2009, č. 92, 27 s.  
Kozák, P., Buřič, M., Kouba, A., Polícar, T., 2008. Metodika chovu raka říčního. Edice Metodik (technologická řada), VÚRH JU Vodňany, č. 83, 36 s.  
Kozák, P., Buřič, M., Polícar, T., 2007. Metodika lovu raků. Edice Metodik (technologická řada), VÚRH JU Vodňany, č. 81, 24 s.  
Kozák, P., Mauric, Z.: Biologie, ochrana a chov raků. VÚRH JU Vodňany. Výukové DVD. 2007  
SOUTY-GROSET, C., HOLDICH, D.M., NOEL, P.Y., REYNOLDS, J.D., HAFFNER, P., (EDS) 2006 *Atlas of Crayfish in Europe*. Museum national d'Histoire naturelle, Paris.  
Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003: *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha, 308 s.  
Bulletin VÚRH JU, Vodňany, 3, 2001.  
Bulletin VÚRH JU, Vodňany, 1-2, 2000.  
Bulletin VÚRH JU, Vodňany, 3, 1998.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant diplomové práce: **Hamid Niksirat Hashjin**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání diplomové práce: **7. prosince 2012**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2014**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
L.S.  
389 25 Vodňany (2)

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce .....	9
3. Literární přehled.....	10
3.1. Elektrostimulace .....	11
3.2. Pohlavní soustava raků.....	14
3.2.1. Samčí pohlavní orgány.....	14
3.2.2. Spermatofory a spermie.....	15
3.2.3. Samičí pohlavní orgány.....	18
3.2.4. Růst oocytů a vitelogeneze .....	19
3.2.5. Orgány pohlavních hormonů .....	20
3.2.6. Páření raků.....	21
3.2.7. Ovulace a oplodnění vajíček.....	23
3.2.8. Intersexualita a hermafroditismus .....	23
3.2.9. Gonadosomatický index .....	24
3.2.10. Životní cyklus raků .....	25
3.3. Hybridizace.....	29
4. Materiál a metodika.....	31
4.1. Období páření raků.....	31
4.1.1. Pozorování období páření raků v roce 2012 .....	32
4.1.2. Pozorování období páření raků v roce 2013 .....	33
4.2. Ultrastruktura gamet.....	34
4.2.1. Odběr vzorků samčích gamet .....	34
4.2.2. Odběr vzorků samičích gamet .....	35
4.2.3. Zpracování samčích a samičích gamet .....	35
4.3. Elektrostimulace raků.....	37
4.3.1. Postup experimentů.....	37
4.3.2. Design experimentů .....	39
4.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního .....	45

5. Výsledky.....	46
5.1. Období páření raků.....	46
5.1.1. Pozorování období páření raků v roce 2012 .....	47
5.1.2. Pozorování období páření raků v roce 2013 .....	50
5.2. Výsledky ultrastruktury gamet.....	54
5.2.1. Ultrastruktura samčích gamet .....	54
5.2.2. Ultrastruktura samičích gamet .....	60
5.3. Elektrostimulace raků.....	66
5.3.1. Experiment č. 1 – opakovaná elektrostimulace raka signálního .....	66
5.3.2. Experiment č. 2 – elektrostimulace raka říčního a raka bahenního.....	68
5.3.3. Experiment č. 3 – elektrostimulace raka říčního.....	70
5.3.4. Experiment č. 4 – elektrostimulace raka pruhovaného .....	71
5.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního .....	72
6. Diskuze.....	73
6.1. Období páření raků.....	73
6.2. Ultrastruktura gamet.....	75
6.2.1. Ultrastruktura samčích gamet .....	75
6.2.2. Ultrastruktura samičích gamet .....	76
6.3. Elektrostimulace raků.....	77
6.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního .....	78
7. Závěr .....	80
8. Přehled použité literatury .....	81
9. Seznam příloh .....	85
10. Přílohy .....	86
11. Abstrakt .....	98
12. Abstract .....	99

# 1. Úvod

---

Raci jsou velice úspěšnou a rozšířenou skupinou organismů. V současné taxonomii sladkovodní raci tvoří nejrozsáhlejší část říše koryšů. Do dnešní doby bylo popsáno více než 640 druhů lokalizovaných po celém světě. Raci, tak představují neoddělitelnou součást života lidí, a to v mnoha aspektech (vzdělávacích, vědeckých, estetických, kulturních a rekreačních). Nemluvě o jejich důležitém významu ve vodním prostředí. V přírodě se raci reprezentují jako predátoři nebo i část potravní základny některých ryb. Ve volných vodách působí také jako detritivoři, a jsou tak důležitým prvkem v koloběhu živin a energie ve vodním ekosystému.

Sladkovodním rakům se však nevyhnuly negativní dopady antropogenní činnosti jako znečištění vod a devastace habitatů. K těmto dopadům můžeme také připsat oblibu raků pro zpestření jídelníčku a likvidaci račích populací račím morem. Z těchto důvodů je zapotřebí reprodukce raků v líhních a farmách, odkud mohou být raci introdukováni zpět do původních habitatů. Raci mohou být z farem dodáváni přímo pro gastronomické účely a tím by mohl být omezen jejich lov ve volných vodách.

Ve světle zmíněných skutečností tak nabývá na významu studie reprodukční biologie raků. Především pozorování a pochopení všech základních struktur a funkcí reprodukčního systému, protože reprodukční strategie či péče samic o ráčata obsahují prvky, které jsou v celé živočišné říši jedinečné.



## 2. Cíl práce

---

Cílem mé diplomové práce je studium reprodukční biologie u raků se zaměřením na proces páření, interval mezi pářením a kladením vajíček, oplodnění a morfologickou strukturu samčích a samičích gamet.

### 3. Literární přehled

---

**Systematika druhů raků podrobených experimentům (Kozák *et al.*, 2009).**

<u>Kmen:</u>	Arthropoda	Členovci
<u>Podkmen:</u>	Crustacea	Korýši
<u>Třída:</u>	Malacostraca	Rakovci
<u>Řád:</u>	Decapoda	Desetinožci

---

**Podřád:** Pleocyemata

**Infrařád:** Astacidea

**Nadčeleď:** Astacoide Raci

<u>Čeleď:</u>	<u>Podčeleď:</u>	<u>Rod:</u>	<u>Druh:</u>
Cambaridae	Cambarinae	<i>Orconectes</i>	<i>O. limosus</i> (rak pruhovaný)
		<i>Procambarus</i>	<i>P. clarkii</i> (rak červený)
Astacidae	Pacifastacidae	<i>Pacifastacus</i>	<i>P. leniusculus</i> (rak signální)
	Astacinae	<i>Astacus</i>	<i>A. astacus</i> (rak říční)
			<i>A. leptodactylus</i> (rak bahenní)

### 3.1. Elektrostimulace

Jedná se o metodu získávání spermatu pomocí elektrických stimulů dodávaných do těla samců. (Kliment *et al.*, 1989). Metoda elektrostimulace byla využita k získávání spermatoforů se spermii od vyšších korýšů. Sandifer a Lynn (1980) popsali metodu elektrostimulace u sladkovodní krevetky Rosenbergovy (*Macrobrachium rosenbergii*) a krevetách *Palaemonetes pugio*, *Penaeus vulgaris* a *Sicyonia ingentis*. Kooda-Cisco a Talbot (1983), metodu elektrostimulace úspěšně použili i u humra amerického (*Homarus americanus*). Tato metoda se osvědčila i na sladkovodním druhu raka, australském yabby (*Cherax destructor*), (Jerry, 2001). Ve své bakalářské práci Kubec (2012) popisují ověření použití elektrostimulace samců u druhu raka červeného (*Procambarus clarkii*), raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) a raka pruhovaného (*Orconectes limosus*).

Při správném provedení elektrostimulace je pomocí elektrického impulsu stimulováno svalstvo chámovodu samce. Pozitivní odezva tohoto elektrického stimulu je vytlačení spermatoforů z gonoporů. Elektrický stimul chámovodu nijak samce nepoškozuje a může být použit k získávání spermatu od stejného zvířete opakovaně (Kooda-Cisco a Talbot, 1983; Sandifer *et al.*, 1984; Jerry, 2001). Sandifer *et al.* (1984) poukazuje, že při použití silného elektrického proudu nebo příliš vysokého počtu stimulů za sebou může způsobit vážné poškození zvířete vedoucí až k jeho úhynu.

Tato technika získávání vytlačování spermatoforů má několik výhod (Kooda-Cisco a Talbot, 1983):

- **jednoduchost** techniky vyžadující levné jednoduché elektrické zařízení a standardní laboratorní zařízení,
- **rychlost** provádění techniky, kdy k provedení stimulace stačí jen několik minut na jedno zvíře,
- v případě, že je technika správně použita, zvíře **není** trvale **poškozeno**,
- **není** zapotřebí **usmrcovat** samce, což znamená možnost jejich opakovaného využití.

Zařízení na elektrickou stimulaci, jak jej popisuje Sandifer *et al.* (1984), je složeno z elektrického transformátoru, reostatu, voltmetru a dvou elektrod. K vyvolání elektrického stimulu je také možné použít přístroj AC250K2D (Obr. 1)

od firmy Diametral. Tento transformátor je řízen procesorem a jedná se o zdroj střídavého napětí. Jeho originální uplatnění je v napájení různých zařízení střídavým napětím  $0V \div 255V/2A$ . Ovládání zdroje je jednoduché a provádí se pomocí klávesnice umístěné na čelním panelu přístroje. Zařízení na střídavý proud je pro úspěšnost pokusů elektrostimulace vybaveno dvěma elektrodami, které jsou k přístroji připojené. Elektrody jsou umístěny na základnu pátého páru pereopodů v oblasti kolem vývodů pohlavních orgánů (gonoporů). Po přiložení elektrod k tělu samce byl vyvolán elektrický stimul a cyklus frekvence podnětů byl pomalu zvyšován (Kubec, 2012).



**Obr. 1** – Přístroj AC250K2D. (Foto: Kubec, 2012).

Technika získávání spermatoforů se skládala ze dvou procedur, nejprve se obě elektrody přidržely na bázi pátého páru kráčivých nohou, po dobu cca 20 sekund, poté se jedna elektroda nechala na místě v okolí gonoporů. Druhou elektrodou se pravidelnými jemnými tahy samci „hladili“ na bázi pátého páru kráčivých nohou. Avšak i přesto, že se tento postup osvědčil, nemusí vést jeho uplatnění k pozitivním výsledkům u všech jedinců, proto je důležité vždy vyzkoušet více technik (Kubec, 2012).

V předchozí práci Kubec (2012) popisuje experiment elektrostimulace na druhu raka pruhovaného z čeledi Cambaridae. Elektrostimulaci bylo vystaveno celkem 10 samců při napětí 20 V. V tomto experimentu nebylo dosaženo očekávané odezvy od žádného ze samců a experiment byl tak ukončen s negativním výsledkem. Stejného negativního výsledku bylo dosaženo také u experimentu na 36 samcích druhu raka červeného. U každého z 36 samců bylo použito napětí 15 V.

Naopak úspěšné ověření užitečnosti elektrostimulace bylo prokázáno na dvou experimentech druhu raka signálního z čeledi Astacidae (Kubec, 2012). První experiment vytlačení spermatoforů pomocí elektrostimulace byl proveden mimo období páření tohoto druhu při napětí 20 V. Tento experiment byl úspěšný při napětí u 9 z 15 samců (60 %), kdy došlo při různém napětí k vytlačení spermatoforů alespoň z jednoho gonoporu. Zbýlých šest samců (40 %) nereagovalo na elektrostimulaci žádnou odezvou bez rozdílu na velikosti, hmotnosti nebo počtu klepet. Druhý experiment na druhu raka signálního byl proveden v období páření tohoto druhu. Ověřovala se tak účinnost elektrostimulace v období páření a mimo období páření raků signálních. Elektrostimulaci bylo vystaveno celkem 12 samců. Samci byli vystaveni napětí 10 V a 15 V. Jednalo se o menší napětí, než bylo použito při elektrostimulaci mimo období páření tohoto druhu. Předpokládalo se, že když se jedná o období páření raků a působí samčí hormony, nebude třeba stejného napětí, jako mimo období páření. Úspěšnost elektrostimulace 12 samců raka signálního v období páření při různém napětí dosáhla 67 %. Raci podstoupili elektrostimulaci pouze jednou (Kubec, 2012).

Získávání a shromažďování spermatoforů se spermii může rozšířit reprodukční techniky. Získané spermatofory mohou být použity při umělém oplodnění samic *in vitro* nebo studovány pro pochopení mechanismů při jejich dlouhodobém skladování (Kooda-Cisco a Talbot, 1983). Sandifer *et al.* (1984) zjistili, že spermie získané elektrostimulací, mají normální morfologii a jsou zralé. Spermie byly použity k umělému oplození, po kterém nastal normální embryonální vývoj vajíček. Kubec (2012) popisuje, že vzorky spermatoforů se spermii vyšetřených pod mikroskopem prokázaly, že spermie po vyloučení z těla samců nejsou aktivní. Je zde velká pravděpodobnost, že po procesu spáření, musí proběhnout ještě tzv. kapacitace spermii. To v podstatě vylučuje přímé použití takto získaných spermii k okamžitému oplodnění vajíček samice u raků.

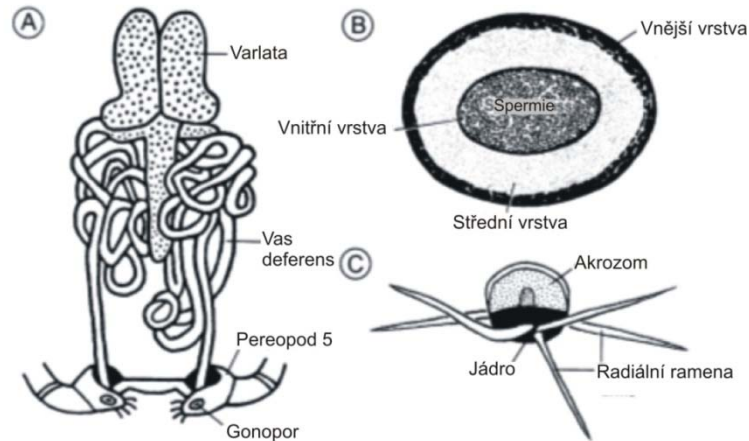
## 3.2. Pohlavní soustava raků

Raci se vyznačují jako gonochoristé (oddělené pohlaví) s vnějším oplodněním. Samce a samice je možné rozlišit podle vnějších pohlavních rozdílů, mezi které patří především forma pleopodů a poloha gonoporů. U samců se nachází gonopory na základně článku pátého páru pereopodů, zatímco u samic se nachází na třetím páru pereopodů. U samců čeledi Astacidae a čeledi Cambaridae je první a druhý pár pleopodů utvořen do struktury kanálků, které se podílejí na přenosu spermatoforů. Samice mají sice první pár pleopodů zakrnělý, ale na třetím až pátém páru je možné nalézt velké množství drobných štětin (oosety). Některé tyto štětky jsou přizpůsobeny pro upevnění vajíček. U samců se na třetím až pátém páru pleopodů vyskytují podobné štětky, ovšem jejich velikost i množství je menší (Holdich, 2002). Vnější pohlavní orgány, varlata nebo vaječníky, jsou u raků uloženy dorzálně v dutině hlavohruďi mezi spodinou srdeční dutiny a žaludkem. Jejich velikost a vzhled je závislý na věku a reprodukční kondici jedince. V období reprodukce dochází ke zvětšení vnitřních reprodukčních orgánů. U samců dostávají varlata mléčnou barvu v důsledku produkce spermií. Vaječníky se u samic začínají plnit žlutohnědými oocyty (Vogt, 2002). U raků se mohou vyskytovat i mezipohlavní jedinci, kteří se vyznačující samčími i samičími znaky a objevují se pravidelně v nízkých frekvencích u mnoha druhů. Funkční hermafroditismus je však u raků velmi vzácný (Rudolph, 1995a, b).

### 3.2.1. Samčí pohlavní orgány

Varlata jsou samčím pohlavním orgánem, kde probíhá spermatogeneze (vývoj finálních spermatid ze spermatogonií) a spermioogeneze (vývoj spermatozoí ze spermatid). Během prvního a druhého meiotického dělení se ze spermatogonií vyvíjejí spermatocyty a spermatidy. Varlata se u čeledi Astacidae skládají z párových předních laloků a protáhlého nepárového zadního laloku (Obr. 2). Samčí pohlavní orgány raků jsou pokryty vazivovou kůrou (vnější spojovací vazivo) a jsou složeny z množství semenotvorných tubulů (kanálků). Tyto tubuly obsahují Sertoliho buňky včetně různých vývojových stádií zárodečných buněk. V semenotvorných tubulech varlat probíhá spermatogeneze a spermioogeneze synchronně. V jednom semenotvorném tubulu lze nalézt jedno nebo dvě vývojová stádia. Tato stádia mohou být odlišná od stádií v ostatních semenotvorných tubulech. Semenotvorné tubuly se z obou stran varlat slučují do sběrných kanálků, na které navazují do klubíčka stočené vývodné pohlavní cesty – chámovody (*vas deferens*) a ústí na bázi (přesněji na koxálním článku)

pátého páru pereopodů. V chámovodech dochází k formování a balení spermatozoí (spermii) do spermatoforů, které hrají roli při přenosu spermatu od samce k samici během páření (Vogt, 2002).



**Obr. 2** – Pohlavní soustava samce (A – Holdich a Reeve, 1988; B, C – Dudenhausen a Talbot, 1983). A – celkový pohled na samčí pohlavní orgány; B – průřez spermatoforem ve vývodných pohlavních cestách; C – uvolněná spermatozoa s dlouhými radiálními rameny.

Spermatogonie se ve zralých varlatech mitoticky dělí a vstupují do meiózy. Tímto procesem prodělávají vývoj z primárních a sekundárních spermatocytů na spermatidy. Během spermiogeneze se u spermatidů vytváří akrozom s radiálními rameny a vzniká spermatozoa. Poté dochází k přeměně jader a za pomoci Sertolihových buněk se vstřebává přebytečná cytoplazma. Existují důkazy, že tento typ buněk má význam i v produkci a sekreci mukopolysacharidů, které obklopují každou spermii (Moses, 1961).

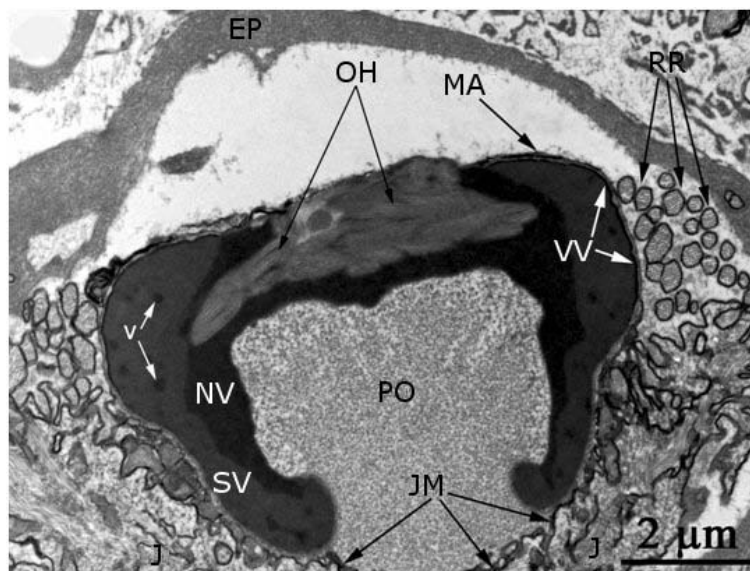
### 3.2.2. Spermatofory a spermie

Spermie raka má průměrnou velikost 0,015 mm. U raků není zapotřebí, aby spermie v samičím traktu plavali na dlouhé vzdálenosti jako tomu je u ostatních zvířat s vnitřním oplodněním nebo ve vodním prostředí u zvířat s vnějším oplodněním. Spermie tak postrádají klasický bičík a jsou víceméně nepohyblivé (Poljaroen *et al.*, 2010). Oproti tomu jsou spermie kromě složitěho akrozomu a jádra vybaveny také radiálními rameny (Obr. 3), která tvoří zvětšené jádro a svazek mikrotubulů (Beach a Talbot, 1987).

Niksirat *et al.* (2013a) uvádí, že oblast akrozomu se nachází v přední části spermie a je rozdělena do dvou hlavních částí:

- hlavní část akrozomálního komplexu je hustá struktura obráceného miskovitého tvaru, složená z prodloužených paralelních vláken, je rozdělena do tří vrstev s různou elektronovou hustotou
- subakrozomální oblast zabírá střední oblast akrozomového komplexu, se dvěma oddělenými částmi s rozdílnou elektronovou hustotou.

Jádro se nachází v zadní části spermii. Společně tyto součásti tvoří akrozom jako kulatou organelu, jejíž největší průměr se pohybuje od 11 do 14  $\mu\text{m}$ , přičemž nejmenší průměr se pohybuje od 5 do 8  $\mu\text{m}$  (López – Camps *et al.*, 1981). Radiální ramena se vyskytují u spermii čeledí Astacidae a Cambaridae, ale chybí u raka *Cherax tenuimanus* a *Cherax albidus* (Beacha Talbot, 1987). Počet těchto ramen je druhově specifický. Moses (1961) uvádí 4 radiální ramena u raka červeného (*Procambarus clarkii*), ale například u raka říčního (*Astacus astacus*) je jich více než dvacet.



**Obr. 3** – Mikrofotografie spermie raka (Kubec, 2012). EP – extracelulární pouzdro; OH – oblast hrotu spermie; MA – membrána akrozomu; RR – radiální ramena; VV – vnější vrstva akrozomu; J – jádro; JM – jaderná membrána; PO – podakrozomální oblast; SV – střední vrstva akrozomu; NV – nejnvnitřnější vrstva akrozomu; V – vakuoly



Radiální ramena spermií u raka říčního jsou utvořena zpočetných svazků mikrotubulů a vláken. Při bližším zkoumání těla gamet lze pozorovat pouze mikrotubuly a jaderné a plazmatické membrány, které se téměř dotýkají vnější membrány jádra. V každém radiálním rameni se může nacházet asi 30 až 40 mikrotubulů. Velikost každého mikrotubulu se pohybuje mezi 180 a 200 pm. Tloušťka radiálních ramen se pohybuje mezi 0,3 a 0,4  $\mu\text{m}$ . Některé mikrofotografie radiálních ramen naznačují možnost, že se mikrotubuly na konci ramen spojují (López-Camps *et al.*, 1981). Podle Talbota a Summarse (1978) není základní funkce radiálních ramen zcela objasněna. Výplň hrotu radiálních ramen je nejspíše druh kontraktilní bílkoviny, jako je aktin či jiný cytoskeletární protein s depolymerizační nebo polymerizační funkcí (Pongtippatee *et al.*, 2007). V chámovodech jsou radiální ramena pevně omotaná kolem spermie. Spermie je i s rameny obalena extracelulárním pouzdem. Tato pouzdra omezují radiální ramena a umožňují tak těsnější obalování spermií ve spermatoforech (Dudenhausen a Talbot, 1983; Niksirat *et al.*, 2013).

V chámovodu jsou masy spermií baleny do spermatoforů, jejichž funkcí je ochrana a přenos spermií během páření od samce k samici. Při vstupu z varlat do chámovodu jsou spermatozoa nejprve obalena epiteliálními sekrety formujícími a sjednocujícími spermie do kompaktní masy. Při postupu spermií od varlat směrem do vzdálenější části *vas deferens* je stěna spermatoforů obohacena o sekrety epitelu chámovodu a vytváří tak obal spermatoforů. Tento sekreční epitel složený z cylindrických buněk je jednovrstevný a je obalen pouzdem z pojivové tkáně (Dudenhausen a Talbot, 1983). Zralé spermatofory raka jsou složeny z kompaktní masy spermií a třívrstevného obalu spermatoforu. V této podobě jsou pružné a lepivé spermatofory uchovány až do páření v distální části chámovodu. Spermatofory jsou odváděny chámovody, které ústí do gonoporů (Vogt, 2002).

Spermatofory mají jednoduchý cylindrický tvar s délkou 4 – 9 mm a s průměrem do 1 mm. U raků čeledi Astacidae samec při páření vytlačené spermatofory přilepí dozadu na ventrální (spodní) stranu hlavohrudi samice. Zatímco samice raků čeledi Cambaridae mají na zadních sternitech (sklerotizované destičky na břišní straně tělních článků členovců) hlavohrudi semennou schránku (*annulus ventralis*). Při páření umístí samec spermatofory do této schránky. Proto je velmi obtížné u této čeledě raků rozpoznat spářenou samici od nespářené (Vogt, 2002).

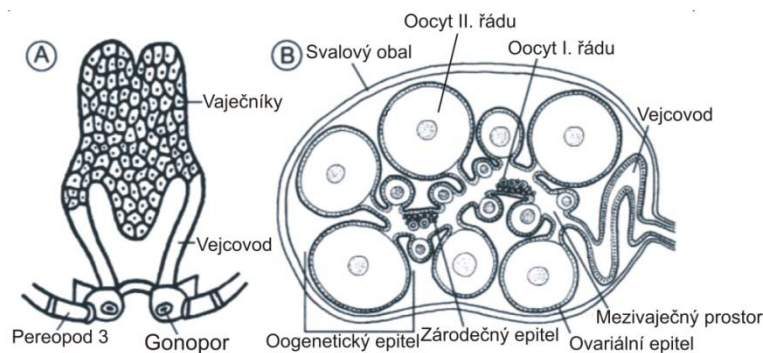
Obal přilepeného spermatoru ve vodě rychle tvrdne. Spermatory jsou na těle samice dobře viditelné i po několik týdnů. Obal spermatorů je odolný proti vlivům okolního prostředí a chrání tak spermie po delší časový odstup mezi pářením a ovulací vajíček (Vogt, 2002).

Během kladení vajíček, kdy jsou spermie uvolněny ze spermatoru, se pouzdra kolem spermií rozpouštějí a radiální ramena se rozevírají. Pomocí radiálních ramen se okamžitě připojuje spermie k vajíčku, aby mohlo dojít k přesunutí akrozomu a přímému kontaktu s povrchem vajíčka. Během kontaktu spermie s vajíčkem musí akrozom proniknout chorionem (vnější obal zárodku) vajíčka a posouvat jádro směrem k vajíčku. Postupně se tak samčí genetický materiál přenesse do vajíčka samice (Vogt, 2002).

### **3.2.3. Samičí pohlavní orgány**

Vaječníky jsou vakovitého tvaru a trochu se podobají jetelovému lístku. Jejich barva a velikost se mění v závislosti na vývoji vajíček. V době pohlavního klidu jsou vaječníky bělavé, v období zrání vajíček se zbarvení mění na červenohnědé. Ando a Makioka (1998) popisují vaječník jako trojlaločný orgán. Vaječníky se skládají ze dvou předních a jednoho zadního vaku, ty jsou obalené tenkým svalovým pláštěm (Obr. 4). Tyto vaky jsou utvořeny pomocí ovariálního epitelu, který je zahnutý dovnitř a vytváří mnoho oogenetických váčků. Každý tento váček obsahuje jeden oocyt I. nebo II. řádu. Zárodečný epitel (germarium) je soustředěn ve středu vaječnicků a je spojen s vaječnickovým epitelem. Zárodečný epitel obsahuje oogonie, malé oocyty I. řádu a somatické intersticiální buňky. Zárodečný epitel produkuje oogonie po celou dobu reprodukčního cyklu samice (Vogt, 2002).

Podle Krola *et al.* (1992) není oogeneze u raků ještě zcela vyjasněna ve všech detailech a popis tohoto procesu se odvíjí z dostupných informací o oogenezi u řádu desetinožců (Decapoda). Z oogonií se ve folikulech vyvíjejí a rostou oocyty I. řádu. Toto stádium opouští zárodečný epitel ve velikosti 30 až 50  $\mu\text{m}$  a formuje vaječnickový epitel do nového oogenetického váčku. Zde se oocyt usazuje a začíná meiotické dělení (Abdu *et al.*, 2000). Oocyty zde probíhají různými fázemi až do sekundárního dělení ve velikosti 400  $\mu\text{m}$ , které je charakterizováno masivním ukládáním žloutku v cytoplasmě (Vogt, 2002).



**Obr. 4** – Pohlavní soustava samice (A – Holdich a Reeve, 1988; B – Ando a Makioka, 1998). A – celkový pohled na samičí pohlavní ústrojí; B – řez ventrálním vaječnickovým vakem u raka *Procambarus clarkii*

Vaječníky samic raků obsahují těsně před kladením až několik stovek zralých vajíček v závislosti na druhu a velikosti samice (Ando a Makioka, 1998). Zralé oocyty opouštějí vaječníky dvěma vejcovody, které jsou kratší a mají menší průměr než chámovody. Vejcovody jsou tvořeny jednobuněčným epitelem obklopeným pojivovou tkání se svalovými buňkami. Před ovulací se začíná distální část vaječnicků plnit mléčnou tekutinou. Vajíčka jsou červenohnědá až červenočerná o průměru 2 až 3 mm a hmotností 11 až 17 mg a jsou centrolecitálního typu, kdy je žloutek uložen uprostřed vajíčka (Vogt, 2002).

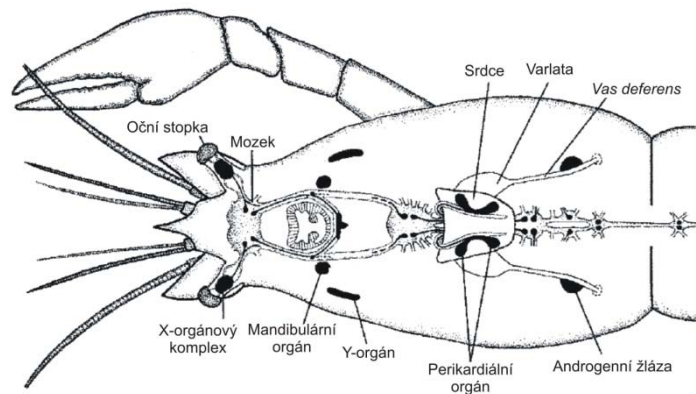
### 3.2.4. Růst oocytů a vitelogeneze

Růst oocytů u raků je převážně založen na ukládání lipidů a bílkovinných rezervách. Vývoj oocytů můžeme rozdělit na primární a sekundární vitelogenezi (Vogt, 2002). Abdu *et al.* (2000) rozlišil celkem pět stádií primární vitelogeneze a tři fáze sekundární vitelogeneze. Ve stádiích primární vitelogeneze jsou ukládány lipidové kapičky a probíhá syntéza glykoproteinů o nízké molekulové hmotnosti. Sekundární vitelogeneze se vyznačuje synchronním růstem skupin oocytů, masivní akumulací žloutku a přítomností proteinů žloutku.

Račí oocyty jsou schopné utvářet žloutek již od primární vitelogeneze až do ovulace vajíček. Žloutkové proteiny jsou syntetizovány na ribozomech v drsném endoplazmatickém retikulu a jsou v něm uchovávány jako malé částice. Tyto žloutkové částice jsou poté baleny do žloutkových kuliček. V sekundární vitelogenezi oocytů je tento základní proces syntézy žloutku doplněn o prekurzory extraovariálního žloutku. Tyto prekurzory, jsou pravděpodobně syntetizovány v hepatopankreasu (Vogt, 2002).

### 3.2.5. Orgány pohlavních hormonů

Dozrávání gonád je u raků řízeno hormonálně. Hormony ovlivňující reprodukci a dozrávání gonád jsou produkovány několika orgány (Obr. 5), které jsou buď ektodermálního původu, nebo vznikly z nervové soustavy. X-orgánový komplex, uložený v očních stopkách raka, je složený z X-orgánu a sinusové žlázy. X-orgán je místem produkce neurohormonů, z nichž k nejvýznamnějším patří inhibitory vývoje gonád. Reprodukční hormon raků odpovědný za dozrávání gonád je syntetizován mandibulárním orgánem. Tento orgán je párový útvar v pojivové tkáni zadní části objícnového prstence nervové soustavy. Androgenní žláza je u raků vytvořena u mláďat obou pohlaví, nejvíce je však vyvinuta u samců. Hormon androgenní žlázy podporuje mimo jiné utváření spermií ve varlatech (Vogt, 2002; Ďuriš *et al.*, 2013).



**Obr. 5** – Pozice hormonálních orgánů u raka (Vogt, 2002)

### 3.2.6. Páření raků

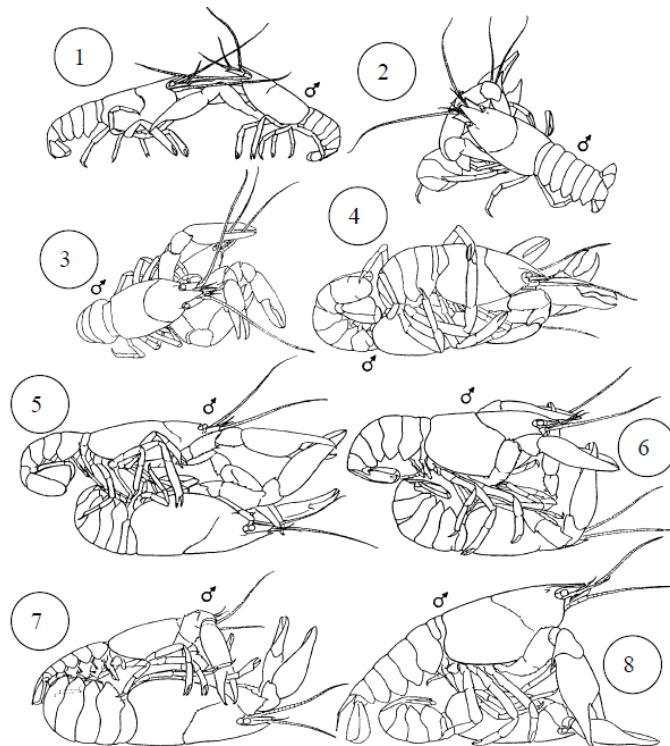
Reprodukce raků je velmi ovlivněná životními podmínkami prostředí jednotlivých druhů. Mezi nejdůležitější faktory pro řízení reprodukce raků patří teplota vody a fotoperioda. Především záleží na dozrávání oocytů ve vaječnicích samic před pářením. V lokalitách s nižší teplotou vody mohou oocyty dozrávat jen jednou za dva roky. Reprodukce je také závislá na zdravotním stavu raků, jejich stáří, velikosti a kondici (Taugbøl *et al.*, 1987).

Varlata a vaječníky raků čeledi Astacidae dozrávají v období mezi červnem a zářím. Během období páření dochází ke zvětšení a zblednutí gonopodů u samců. U samic nastává mléčné zabarvení vejcovodů a žláz (*glair glands*) na okrajích abdomenu. K páření raků v našich klimatických podmínkách dochází na podzim, avšak u raka pruhovaného bylo zjištěno i druhé, jarní, páření, ke kterému dochází v březnu až dubnu (Hamr, 2002). Délka reprodukčního cyklu závisí na podmínkách lokalit, v nichž se raci nachází. Vogt (2002) uvádí, že páření raků je řízeno a regulováno hormonálně. Páření raků začíná s poklesem teploty vody a se zkracující se fotoperiodou v podzimním období. Páření není přesně vázáno na určitou teplotu nebo na určitý termín, ale vyšší teplota vody může reprodukční sezónu raků oddálit. Reynolds (2002) poukazuje, že páření raků může probíhat již při teplotě vody 10 °C. Pro začátek páření raků je důležitá i fotoperioda, ale v oblastech s mírným podnebným pásmem je teplota vody hlavním stimulem. Fotoperioda páření ovlivňuje jen nepřímo. Vedle těchto podmínek má na průběh páření významný vliv i individuální proces svlékání krunýře jednotlivých raků. Proto se nepáří všichni raci v populaci najednou, ale dochází k postupnému páření připravených jedinců (Skurdal a Taugbøl, 2002). Neopomenutelný je samozřejmě i vliv feromonů na iniciaci páření (Ingle, 1977).

Pohlavně dospělí samci a samice se v podzimním období vyznačují zvýšenou aktivitou i v průběhu dne. Vnější pohlavní orgány (gonopody) samců i samic v tomto období bělají a duří. Žlázy po stranách zadečku (abdomenu) u samic, které při uvolňování oocytů produkují sliz, se v tomto období výrazně vyvíjejí a bělají (Kozák *et al.*, 2008). U čeledi Cambaridae je páření raků ovlivněné reprodukční formou. Hobbs (1988) popisuje dvě reprodukční formy. Tyto formy označují období, kdy je samec sexuálně aktivní. Forma I, pohlavní orgány samce jsou funkční a jedinec je schopen se pářit. Vyskytuje se v období páření jednotlivých druhů. Po ukončení reprodukce se samci obvykle svlékají do formy II (viz. rak červený). Forma II nám označuje mezidobí,

kdy samec není schopen páření. Zpravidla se vyskytuje během vegetační sezóny a končí začátkem reprodukčního období, kdy se samci svlékají do formy I. Forma I a forma II se pravidelně střídají, ale může docházet k prodloužení doby trvání jedné z forem.

U raků probíhá vnější oplodnění. V období páření samec sleduje samici, přechází s ní do přímého kontaktu, pevně ji uchopí klepety, obrátí ji na hřbet a stlačuje její klepeta ke dnu. Při páření samec vytlačuje spermatofory se spermatem z ústí pohlavních cest na bázi pátého páru pereopodů (Obr.6). Vytlačené spermatofory jsou samcem pomocí gonopodů umístěny a přilepovány na ventrální (spodní) stranu samice v blízkosti vývodů jejích pohlavních cest nebo u čeledi Cambaridae do tzv. *annulusventralis*. Obal spermatoforů ve vodě rychle tvrdne (Skurdal a Taugbøl, 2002).



**Obr. 6** – Průběh páření raků (Pöckl, 1999).

### 3.2.7. Ovulace a oplodnění vajíček

Ke kladení vajíček a jejich upevnění na pleopody samic dochází v několika dnech po páření raků. Délka této pauzy mezi pářením a kladením vajíček je závislá na teplotě vody. Při pokusech v laboratorních podmínkách se ukázalo, že většina samic klade a upevňuje svá vajíčka na pleopody v rozmezí jednoho až devíti dnů od páření (Vogt, 2002). Woodlock a Reynolds (1988) poznamenávají schopnost samic uvolňovat vajíčka i bez předchozího spáření se samci. V těchto případech jsou nejdůležitějším stimulem pro kladení vajíček hormonální a abiotické podmínky.

Ke kladení vajíček samicí dochází především v nočních hodinách a trvá 2 až 3 hodiny. Samice se musí nejprve na kladení důkladně připravit. Samička raka stočí zadní část abdomenu pod přední část a vytvoří téměř uzavřenou dutinu. Krátce před kladením vajíček začínají slizové žlázy, umístěné na abdomenu samic, produkovat sliz. Zralé oocyty se hromadí v distální části vaječníků a jsou při kladení uvolňovány z vývodů pohlavních cest. Uvolněné oocyty se při rytmickém pohybu samičího abdomenu mísí se slizem, který rozpouští ztvrdlé obaly spermatoforů připevněných na ventrální straně samice u vývodů pohlavních cest (u čeledi Cambaridae tzv. *annulusventralis*) a uvolňuje spermie, připravené k oplození vajíček. Když je masa spermií uvolněna ze spermatoforu během ovulace vajíček, obal spermatoforů se rozpouští a radiální ramena se roztáhnou. Pomocí nich se přichytí spermie na vajíčka a umožní přímý kontakt akrozomu s povrchem vajíčka. Oplodněná vajíčka jsou poté pomocí produktů žláz (*glairglands*) na abdomenu samic uchycena na pleopody. Na pleopodách samic probíhá až do léta inkubace vajíček a následné líhnutí ráčat (Vogt, 2002). Po oplodnění nastává inkubace vajíček, během ní může dojít ke ztrátám na vajíčkách například vlivem špatného oplození vajíček, nedostatečného uchycení na pleopodech, predací ryb nebo z důvodu zaplísnění vajíček (Skurdal a Taugbøl, 2002).

### 3.2.8. Intersexualita a hermafroditismus

Intersexualita je také známa pod názvem gynandromorfismus. Jedná se o výskyt samčích i samičích pohlavních charakteristik u jedince. Gynandromorfismus se sice může projevit pouze na vnější morfologii, ale někdy se může projevit i na diferenciaci gonád. V tomto případě jsou jedinci raků obvykle plně funkčními samci. Nejčastější výskyt intersexuality byl pozorován u čeledě Parastacidae (Vogt, 2002). Rudolph (1995a,b) uvádí, že intersexualita byla zjištěna také u čeledě Astacidae,

především u rodů *Astacus* a *Pacifastacus*. Z čeledi Cambaridae se vyskytla intersexualita u rodů *Cambarus*, *Procambarus*, *Orconectes* a *Cambarellus*.

Rudolf (1995b) popisuje složení gonád intersexuálních jedinců druhu *Samastascus spinifrons*. U těchto jedinců byl nalezen na levé straně vaječník s vejcovodem, zatímco na druhé straně byl *ovotestes*. *Ovotestes* byl složen z vaječníku a vejcovodu v přední části a v zadní části byla varlata s chámovodem. Vaječníky na levé straně těla zkoumaných jedinců obsahovaly oocyty v primární vitelogenezi a na pravé straně byly oocyty před vitelogení fází. Testikulární část *ovotestes* byla schopná produkování spermií, ty se hromadili v dutině chámovodu. U intersexuálních jedinců druhu *Cherax quadricarinatus* byl také dokázán výskyt *ovotestes* s funkčními varlaty a částmi vaječníku, které byli pozastaveny v před vitelogení fází. Tito jedinci vykazovali všechny vnější znaky samců, ale i přítomnost samčích a samičích gonoporů (Sagi *et al.* 1996).

K hermafroditismu dochází u raků jen zřídka. Práví hermafroditi vlastní plně funkční samčí a samičí reprodukční orgány, a to buď současně, nebo postupně. Hermafroditismus byl doložen pouze u raka *Pacifastacus nicoletti* (Rudolf, 1995a). V případě tohoto druhu rozlišujeme dva základní sexuální typy: primární samice a protandriční hermafroditi. Tito hermafroditi mají *ovotestes*, takže mohou produkovat spermie a po postupném přechodu ze samce na samici s progresivními změnami v histologii gonád mohou také produkovat vajíčka (Vogt, 2002).

### **3.2.9. Gonadosomatický index**

Gonadosomatický index (GSI) je určován jako poměr hmotnosti gonád k celkové hmotnosti raka. Gonadosomatický index je různý v závislosti na druhu raka a na době jeho zjištění. GSI dosahuje nejvyšší hodnoty těsně před ovulací. Na začátku reprodukčního období tvoří gonády raků méně než 0,1 % živé hmotnosti. Bezprostředně před ovulací však dosahují v závislosti na druhu raka přibližně 4 až 6 % (Vogt, 2002; Kozák *et al.*, 2004).



### 3.2.10. Životní cyklus raků

#### 3.2.10.1 Astacidae

##### Rak říční (*Astacus astacus*)

Samci raka říčního pohlavně dospívají ve velikosti od 60 do 70 mm a věku 3 let. Samice dospívají ve věku 3 až 4 let ve velikosti 70 až 95 mm (Skurdal a Taugbøl, 2002). Westman *et al.* (1993) poukazuje na faktory, které mohou ovlivnit věk a velikost při dosažení pohlavní dospělosti. Především se nejedná jen o teplotu a kvalitu vody, ale i o potravní nabídku a hustotu dané populace. Samci tohoto druhu jsou schopni, po dosažení pohlavní dospělosti, se pářit se samicemi každý rok. Zatímco samice jsou občas reprodukčně neaktivní každý druhý a někdy i každý třetí rok (Skurdal a Taugbøl, 2002).

Pro reprodukci raka říčního je charakteristický konec září až první polovina října, kdy teplota vody klesá pod 8 až 12 °C. Při páření samec přilepuje bílé spermatofory na sternum (báze 3. páru kráčivých noh) samice mezi druhým a čtvrtým párem kráčivých noh. Samec se může pářit s více samicemi. Doba páření trvá obvykle 2 až 3 týdny. Ovulace a oplodnění vajíček nastává do několika hodin, ale může k tomu dojít i do 6 týdnů po páření (Skurdal a Taugbøl, 2002; Vogt, 2002). Pleopodální plodnost raka říčního se zvyšuje s velikostí samic a pohybuje se mezi 87 až 154 vajíčky. Velikost vajíček měří v průměru od 2,8 do 3,1 mm, ale během embryonálního vývoje se mírně zvyšuje (Skurdal a Taugbøl, 1994).

Inkubace vajíček je ovlivněna především teplotou vody a trvá přibližně 1 900 denních stupňů. Tato hodnota představuje dobu 8 až 9 měsíců (Skurdal a Taugbøl, 2002). Hessen *et al.* (1987) předpokládají, že zvýšením teploty může být délka inkubace snížena z 1900 na 1300 denních stupňů, což zkracuje dobu inkubace pouze na 4 měsíce. K líhnutí ráčat dochází zpravidla v průběhu června a začátku července. Nejprve jsou vylihlá ráčata pevně přichycena k tělu samice ještě po několik dní a jsou nepohyblivá. Během prvního svlékání dochází ke změně morfologie ráčat a již nejsou pevně spojeny se samicí. Po 5 dnech až 2 týdnech se ráčata začínají volně pohybovat (Skurdal a Taugbøl, 2002). Příloha 1.

### **Rak bahenní (*Astacus leptodactylus*)**

Rak bahenní dosahuje pohlavní dospělosti ve 3 až 4 roce života při velikosti těla od 75 až 85 mm (Skurdal a Taugbøl, 2002). Rozmnožování raka bahenního se liší v rámci Evropy, v našich podmínkách dochází k páření populací v průběhu října a na začátku listopadu při teplotě 6 až 12 °C. Samice kladou vajíčka o několik dní až 6 týdnů později po páření (Skurdal a Taugbøl, 2002; Kozák *et al.*, 2009). Počet vajíček se liší v závislosti na velikosti samice, obvyklá pleopodální plodnost samic se pohybuje na úrovni 200 až 400 vajíček. U tohoto druhu existují záznamy, kdy dosáhla plodnost samic 700 až 800 vajíček. Velikost vajíček se pohybuje u raka bahenního od 2,2 do 3,3 mm (Stucki, 1999). Vajíčka o průměrné velikosti 2,8 až 3,0 mm dosahují hmotnosti 12,4 až 13,6 mg (Vasileva *et al.*, 2006). V našich klimatických podmínkách probíhá inkubace po dobu 7 až 8 měsíců. Líhnutí ráčat probíhá od konce května až do konce června při teplotě 18 až 22 °C. Vylíhnutá ráčata zůstávají v blízkosti samice po dobu asi 20 až 25 dní do prvního svlékání, kdy samici opouští (Skurdal a Taugbøl, 2002). Příloha 2.

### **Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)**

Rak signální pohlavně dospívá ve věku 2 až 3 let při velikosti 60 až 90 mm. Samci raka signálního rostou mnohem rychleji než samice, proto mohou pohlavně dospět i o rok dříve. Páření raka signálního nastává na podzim nejčastěji v průběhu října. Proces páření a oplodnění vajíček je u raka signálního velmi podobný jako u ostatních druhů čeledi Astacidae. Samice raka signálního disponují velkou pleopodální plodností pohybující se v rozmezí 200 až 500 vajíček v závislosti na velikosti samice. Velikost vajíček je v rozmezí od 2,3 do 3,0 mm, během embryonálního vývoje se jejich velikost zvyšuje. Inkubace vajíček se v závislosti na teplotě pohybuje od 1 500 do 2 200 denních stupňů (6 až 9 měsíců), nejčastěji se hodnota inkubace pohybuje okolo 1 900 denních stupňů. Ráčata se líhnou od dubna do konce července. Vylíhlá ráčata se zhruba po jednom týdnu svlékají do druhého vývojového stádia, kdy se osamostatňují od samice a volně se pohybují (Lewis, 2002). Příloha 3.

### **3.2.10.1. *Cambaridae***

#### **Rak pruhovaný (*Orconectes limosus*)**

Rak pruhovaný dosahuje pohlavní zralosti již ve druhém roce života, přesněji ve stáří 15 až 16 měsíců při velikosti 50 až 60 mm (Hamr, 2002). Někteří rychle rostoucí jedinci mohou pohlavně dospívat už v prvním roce života na konci prvního vegetačního období. Tito jedinci se již mohou účastnit reprodukce (Kozák *et al.*, 2007).

Podobně jako u evropských druhů raků probíhá páření raka pruhovaného v září až říjnu. Sbližování a páření samic tohoto druhu probíhá po celé podzimní období. Spermatofory samců jsou ukládány do *annulus ventralis* na spodní straně samice. Pro tento druh je však ještě charakteristické druhé páření na jaře (březen až duben). Vajíčka nejsou kladena ihned na podzim, ale až na jaře na konci května po druhém páření. Takto nedochází k zastavení vývoje (diapauze) embryí během zimního období. Průměrná plodnost samic raka pruhovaného je 300 vajíček s velkým rozmezím daným velikostí samice. K líhnutí ráčat dochází již koncem června. Ráčata se zdržují v okolí matky i poté co už nejsou k samici připojena. Rak pruhovaný se dožívá přibližně 4 let a velikosti okolo 60 mm (Hamr, 2002). Příloha 4.

#### **Rak červený (*Procambarus clarkii*)**

U raka červeného patří mezi sekundární znaky pohlavně zralých samců nápadné kopulační háčky na bázi třetího a čtvrtého páru kráčivých nohou, zduřelé gonopody a zvětšená klepeta. Pohlavně dospělí samci raka červeného se označují jako první forma (forma I). U těchto raků jsou klepeta mnohem větší než u nedospělých a sexuálně neaktivních raků druhé formy (forma II). U samic raka červeného zahrnujeme mezi sekundární pohlavní znaky zvětšená klepeta, robustnější zadeček a výrazný *annulus ventralis* mezi bázemi pereopodů. Sexuálně aktivní rak červený se páří kdykoliv dojde ke kontaktu s vnímavým partnerem (Huner, 2002). Huner a Avault (1976) uvádí, že pro dosažení pohlavní zralosti je u raka červeného zapotřebí nejméně 11 svlékání (období mezi svlékáním trvá 6 až 30 dní v závislosti na teplotě vody). Po určité době dojde k ukončení sexuální aktivity samců a přeživší samci se svléknou t do pohlavně neaktivní růstové formy II. Není zatím zcela jasné, zda podobným procesem procházejí i samice (Huner, 2002).

Období páření tohoto druhu je nejčastěji charakteristické pro jaro nebo začátek léta. Ovšem v případě, že se v populaci vyskytují pohlavně dospělé samice a reprodukčně aktivní samci ve formě I, můžeme pozorovat páření po celý rok. Po několika týdnech až měsících po páření probíhá kladení a oplodnění vajíček. Pleopodální plodnost druhu raka červeného je ovlivněna velikostí samice, počet vajíček dosahuje při celkové délce samice 60 mm okolo 50 vajíček, u 90 mm dlouhé samice je to už 300 vajíček a 120 mm samice může ovulovat více než 600 vajíček. Embryonální vývoj vajíček je ovlivněn teplotou vody. Při teplotě 22 °C probíhá inkubace vajíček 2 až 3 týdny, při poklesu teploty vody pod 10 °C je vývoj zpomalen nebo může být i zastaven. Po vylíhnutí se ráčata po 2 až 3 týdny dvakrát svlékají, než jsou schopni opustit samici. Ovšem i po osamostatnění a oddělení se od samice se ráčata stále zdržují v její blízkosti (ráčata přitahuje k sobě produkcí feromonů). Mladí jedinci se zdržují u samice do té doby, než začne opět zalézat do nory nebo úkrytu (Huner, 2002).

Rak červený dokáže, především v nižších zeměpisných výškách, zplodit až dvě generace ráčat za rok. Velikost pohlavně dospělých jedinců je velmi rozdílná, pohlavní dospělosti mohou jedinci dosáhnout již ve velikosti 45 mm, ale také až při velikosti 125 mm. Životní prostředí zde hraje velkou roli v dozrávání jedinců. Délka života raka červeného je poměrně krátká, v přírodě se dožívá přibližně asi jen 12 až 18 měsíců a v laboratorních podmínkách byl dosažen věk 4 let (Huner, 2002). Příloha 5.

### 3.3. Hybridizace

Hybridizace (křížení) je známá metoda genetického zlepšování. Hybridizací rozumíme vzájemné páření mezi druhy, plemeny, populacemi nebo liniemi. Hlavním důvodem používání hybridizace ve šlechtitelské práci je využití neaditivní složky genetické variance, která při křížení vzdálených genotypů může způsobit heterózní efekt. Výsledná fenotypová hodnota kříženců (hybridů) je však i výsledkem působení aditivní genetické variance. Heterózní efekt bývá omezen zpravidla jen na F1 generaci, což omezuje používání této metody především k produkci užitkových hybridů. Hybridizace může sloužit také jako nástroj pro vznik nových linií (Hulák, 2008; Kocour, 2013).

Mezidruhovú hybridizace se provádí u příbuzných druhů zvířat. Je prokázáno, že čím více jsou druhy příbuzensky vzdálenější, tím je menší pravděpodobnost vzniku životaschopného potomstva. Úspěch při mezidruhovém křížení závisí především na homologicitě chromozomových párů (shodě ve velikosti a tvaru chromozomů a komplementaritě příslušných alelických párů) po splynutí haploidních jader samčí a samičí gamety. Následkem neúplné homologicky chromozomových párů jsou mezidruhová hybridní neplodní nebo mají omezenou plodnost. Velmi často vznikají také spontánní polyploidní jedinci, a proto se mezidruhovú hybridizace stala nástrojem k indukci a studiu polyploidie (Hulák, 2008; Kocour, 2013).

Dle Hoggera (1988) existuje množství zpráv o mezidruhovém páření raků, ale osud vajíček je neznámý. Vysazení nepůvodních druhů raků do stejné oblasti, kde se vyskytují původní příbuzné druhy raků, může vychýlit procesy normálních mechanismů. Výsledek hybridizace však bývá jen zřídka pozorován ve volné přírodě. Pomocí reprodukční interference je možné dosáhnout mezidruhového páření mezi druhy raků, které jsou příbuzné a mají podobný reprodukční cyklus (Reynolds, 2002). Stempel (1975) zkoušel zkřížit druh raka říčního a druh raka signálního. V případě této hybridizace dosáhl spáření dvou druhů a získal vajíčka. U vajíček byl pozorován začátek vývoje, ale 10 týdnů po nakladení ve fázi očních bodů začala vajíčka hynout. Reynolds (2002) uvádí, že samci nepůvodního druhu obvykle vyhledávají samice původního druhu. Například u čeledi Cambaridae, samci druhu *Orconectes sanbornise* páří častěji se samicemi druhu *Orconectes rusticus* než se samicemi stejného druhu.

Důkazy o mezidruhové hybridizaci jedinců čeledi Astacidae z volné přírody jsou vzácné. Ovšem v laboratorních podmínkách se většina testovaných kombinací mezi samci a samicemi druhů *Austropotamobius pallipes*, *Pacifastacus leniusculus* a *Astacus leptodactylus* spářila a nakladla vajíčka (Holdich *et al*, 1995). U většiny mezidruhových vajíček však byla zaznamenána jejich ztráta z pleopodů během 2 až 4 týdnů. K nejdelšímu uchování vajíček na těle samice (6 až 20 týdnů) bylo prokázáno u samic *Astacus leptodactylus* křížených se samci *Austropotamobius pallipes* a samci *Pacifastacus leniusculus*. Nebyl, ale zaznamenám žádný mikroskopický vývoj vajíček (Holdich *et al*, 1995).

Furrer *et. al*, (1999) popisuje experiment na spárených samicích druhu raka říčního a raka bahenního ve volných vodách. Během experimentu došlo ke ztrátě nakladených vajíček u samic druhu raka říčního, ale u samic raka bahenního byl pozorován vývoj vajíček. Byla získána juvenilní ráčata, která byla ve druhém stádiu porovnána s čistokrevnými juvenilními ráčaty druhu raka říčního a raka bahenního. Hybridní juvenilní ráčata vykazovala jinou morfologii klepet, která byla kratší a širší než klepeta obou čistokrevných druhů raků. U hybridních ráčat bylo také možné pozorovat odlišnosti v charakteristice chytinového krunýře. Přežití ráčat bylo velmi nízké a po dvou měsících došlo k úhynu všech jedinců. Ovšem pro uznání nových hybridů není zcela jasné, zda k hybridizaci skutečně došlo. Jelić *et. al*, (2013) provedl experiment hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního v malých zemních rybnících. Do jednoho rybníku byli nasazeni samci raka říčního a samice raka bahenního. V druhém rybníce byli raci nasazeni samci raka bahenního a samice raka říčního. Po spáření byli samci z rybníků odloveni. Došlo ke spáření obou druhů raků, ale u většiny samic došlo ke ztrátě vajíček nebo úhynu jedince. U samic raka bahenního spárených se samci raka říčního byl, zaznamenám normální vývoj vajíček. Hybridní ráčata byla získána pouze od 3 samic raka bahenního.

## 4. Materiál a metodika

---

### 4.1. Období páření raků

Tento experiment byl zaměřen na pozorování období páření dvou druhů raků. Součástí tohoto experimentu bylo určení časových intervalů všech procesů páření raků od spáření až do fáze naklazení vajíček samicemi raků v našich klimatických podmínkách. Pozorování období páření a kladení vajíček probíhalo na druhu raka říčního (*Astacus astacus*) a druhu raka bahenního (*Astacus leptodactylus*). V rámci tohoto experimentu proběhlo rovněž pozorování období páření při křížení těchto dvou druhů. Také byla pozorována možnost ovulace a naklazení vajíček samice bez přítomnosti samců. Experiment byl proveden během podzimního období v roce 2012. V roce 2013 byl tento experiment, z důvodu porovnání výsledků, znovu proveden.

V průběhu pozorování nebyla teplota vody regulována a závisela pouze na přírodních podmínkách (Příloha 7, Příloha 8). Do nádrží, kde byli drženi raci pro tento experiment, byly umístěny úkryty (na polovinu rozříznutý květináč, Příloha 9). Počet úkrytů a raků v jedné nádrži byl v poměru 1:1. Do každé nádrže bylo zavedeno vzduchování se vzduchovacím kamenem, z důvodu zabezpečení dostatku kyslíku ve vodě. Přítok čerstvé vody do nádrží s raky byl jednou týdně, kdy docházelo v rámci čištění nádrží k odsávání nečistot hadicí a výměně  $\frac{2}{3}$  objemu vody v nádržích.

Skupiny raků, především samice, byly pravidelně pozorovány v několikadenních odstupech (Příloha 7, Příloha 8) a jakékoliv změny v chování raků byly zaznamenány. Samotné pozorování období páření a kladení vajíček spočívalo v manuálním odchytu jedinců, rozlišením pohlaví a u samic bylo vizuálně zjišťováno, zda jsou na ventrální straně samice přichyceny spermatofoxy se spermii. V případě, že v den pozorování probíhalo aktivní páření, nebylo do nádrže významně zasahováno. U spářených samic se obdobným principem zjišťovalo, zda jsou kladena vajíčka nebo již jsou vajíčka nakladena a zbavena obalového šlemu. Kladení vajíček je v tomto experimentu považováno za období, kdy samice uvolňuje vajíčka z vývodů pohlavních cest až do zbavení vajíček obalového šlemu (sliz vyprodukovaný žlázami a zbylé spermie).

Podle těchto pozorování byly určovány intervaly mezi jednotlivými sekvencemi rozmnožování raků.

#### **4.1.1. Pozorování období páření raků v roce 2012**

V roce 2012 probíhalo pozorování v laboratoři Genetického rybářského centra VÚRH ve Vodňanech. K provedení experimentu bylo využito celkem 21 plastových nádrží (o rozměrech 50×50×30 cm). V těchto nádržích byli raci drženi během celého podzimu (září až listopad). Raci drženi po dobu experimentu byli krmeni nařezanou mrkví. Během této části experimentu bylo pozorováno celkem 48 samců a 72 samic obou druhů (24 samců a 36 samic druhu raka říčního; 24 samců a 36 samic druhu raka bahenního). Raci byli rozděleni celkem do šesti skupin, každá skupina měla 3 opakování (Tabulka 1) v poměru pohlaví 1:1. V první až čtvrté skupině vždy byli čtyři samci a čtyři samice jednotlivých druhů raků.

- první skupina – samci raka bahenního se samicemi raka říčního;
- druhá skupina – samci raka bahenního se samicemi raka bahenního;
- třetí skupina – samci raka říčního se samicemi raka bahenního
- čtvrtá skupina – samci raka říčního se samicemi raka říčního.

V páté skupině (čtyři samice raka bahenního) a šesté skupině (čtyři samice raka říčního) byli pouze samice bez samců. Pozorováním těchto dvou skupin jsme měli zjistit, zda jsou samice schopné, při absenci samců, ovulovat a klást vajíčka, popř. zda je možné pozorovat embryonální vývoj vajíček.



**Tabulka 1** – Schéma rozdělení raků do nádrží v roce 2012.

Číslo nádrže	♂	♀
1		Al
2		Aa
3	Al	Aa
4	Al	Al
5	Aa	Al
6	Aa	Aa
7		Al
8		Aa
9	Al	Aa
10	Al	Al
11	Aa	Al
12	Aa	Aa
13		Al
14		Aa
15	Al	Aa
16	Al	Al
17	Aa	Al
18	Aa	Aa

♂ – samec; ♀ – samice; Aa – rak říční; Al – rak bahenní

#### **4.1.2. Pozorování období páření raků v roce 2013**

Proběhlo opakování experimentu, zaměřeného na určení období páření raků a kladení vajíček, který již probíhal na Experimentálním rybochovném zařízení VÚRH ve Vodňanech (dále jen „Model“). Raci, zde byli umístěni do šesti laminátových žlabů (o rozměrech 300×100×100 cm) ve venkovní žlabovně (Příloha 10). Na dno žlabů byl vysypán jemný štěrk (Příloha 11), do kterého byly vsazeny úkryty pro raky (půlené květináče, plastové prefabrikáty; Příloha 9). Samci se samicemi obou druhů raků byli rozděleni do 6 skupin (Tabulka 2). V každé skupině bylo vždy po 5 samcích a 5 samicích.

- první skupina – samci raka říčního a samice raka říčního;
- druhá skupina – samci raka říčního a samice raka bahenního;
- třetí skupina – samci raka bahenního a samice raka říčního;
- čtvrtá skupina – samci raka bahenního a samice raka bahenního;
- pátá skupina – pouze samice raka bahenního;
- šestá skupina – pouze samice raka říčního.

V případě zda proběhlo páření samců se samicemi, byli samci vyjmuti ze žlabu, z důvodu možnosti predace na nakladených vajíčkách.

**Tabulka 2** – Schéma rozdělení raků do skupin v roce 2013.

	1. sk	2. sk	3. sk	4. sk	5. sk	6. sk
♂	Aa	Aa	Al	Al		
♀	Aa	Al	Aa	Al	Al	Aa

♂ – samec; ♀ – samice; Aa – rak říční; Al – rak bahenní

## 4.2. Ultrastruktura gamet

Z důvodu studie morfologické struktury samčích a samičích gamet byla do mé práce zahrnuta také jejich ultrastruktura. Zpracování a pozorování všech odebraných vzorků probíhalo v laboratoři transmisní elektronové mikroskopie, která se nachází v areálu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

### 4.2.1. Odběr vzorků samčích gamet

Ultrastruktura spermií byla popsána pomocí elektronové mikroskopie u celkem 5 druhů samců raků. Jednalo se o druh raka říčního, raka bahenního a raka signálního z čeledě Astacidae. Zbylé druhy samců byli z čeledě Cambaridae, byli to zástupci druhu raka pruhovaného a raka červeného. Zástupci druhů raků, kromě raka červeného dovezeného ze Singapuru, byli odloveni z přírodních zdrojů nacházejících se na území České republiky. Žádný ze samců raků nevykazoval viditelné zdravotní problémy a měli plně vyvinutý reprodukční systém.

Vzorky spermií byly od samců získány pomocí dvou rozdílných metod. Jedna z metod byla elektrostimulace, kdy byly získány spermatofoxy se spermiemi od živých jedinců. V případě, že nebylo možné získat od samců spermatofoxy pomocí elektrostimulace byla provedena jejich pitva. Pro pitvu byli všichni jedinci usmrceni chladem (po dobu 10 min.), dokud nebyla utlumena jejich aktivita. Vzorky spermií byly odebrány a zafixovány v 2,5 % glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru po dobu dvou dní při teplotě 4 °C.

#### **4.2.2. Odběr vzorků samičích gamet**

V rámci pozorování ultrastruktury samičích gamet byly odebrány vzorky oocytů od samic raka říčního. Samice raka říčního byly odloveny z rybníku Kramata na Šumavě. Odlov druhu raka říčního proběhl krátce před začátkem reprodukční sezony. Poté byly samice převezeny do Experimentálního rybochovného zařízení VÚRH ve Vodňanech. Zde byly přechovávány ve venkovních žlabech vystavené přírodním podmínkám.

Vzorky oocytů byly odebrány celkem čtyřikrát, každý odběr vzorku tak reprezentoval jinou fázi zralosti oocytů. Prvně byly odebrány zralé oocyty pomocí pitvy samic raka říčního. Samice byly, podobně jako samci, usmrceny chladem po dobu alespoň 10 min. Při pitvě byl nůžkami rozstříhnut chitinový krunýř hlavohruďi, a pinzetou byly odebrány oocyty. Druhý vzorek reprezentoval vzorky čerstvě ovulovaných oocytů, které byly odebrány na základu třetího páru kráčivých nohou. Zbylé dva vzorky byly získány z abdomenu samice po 1 hodině a po 24 hodinách od nakladení vajíček. Všechny vzorky oocytů byly ihned po odběru zafixovány v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru po dobu dvou dní při teplotě 4 °C.

#### **4.2.3. Zpracování samčích a samičích gamet**

Zpracování a příprava všech vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii byla vždy rozložena do třech dní. První den zpracování se jednalo o vyprání v mycím roztoku, jednalo se o 0,1 M pufr. Po patnáctiminutovém vypírání se odsála veškerá tekutina ve zkumavce. Tento postup se ještě dvakrát opakoval. Po posledním vypírání se do zkumavek napustil pufr společně se 4 % roztokem OsO<sub>4</sub> (oxid osmičelý) v poměru 1:1 na dobu 2 hodin. Vzorky gamet pod vlivem OsO<sub>4</sub> zčernaly, z důvodu jejich lepší viditelnosti. Vzorky se opět ošetřily vypíracím roztokem. Pro odvodnění vzorků byla použita acetonová řada v koncentracích acetonu 30 %, 50 % a 70 %. Při odvodnění vzorků 70% acetonem bylo zpracování vzorků zastaveno a vzorky byly vloženy do chladničky v laboratoři při teplotě 4 °C. Tabulka 3.

**Tabulka 3** – Použité chemikálie a doba působení.

Příprava vzorků 1. den	
Mycí roztok	3 × 15 min
Pufir + 4% roztok OsO <sub>4</sub> 1:1	2 hod
Mycí roztok	3 × 15 min
30% aceton	15 min
50% aceton	15 min
70% aceton	15 min

Druhý den byl ze zkumavek odstraněn 70 % aceton a postupně zaměněn za 80%, 90%, 95% a 100% aceton. Po odvodnění vzorků byly postupně přidány roztoky 100% acetonu a pryskyřice. Poměr acetonu a pryskyřice byl nejprve 2:1, poté 1:1 a naposled 1:2. Nakonec byly zkumavky vyplněny čistou pryskyřicí. Vzorky byly umístěny do chladničky při teplotě 4 °C. Tabulka 4.

**Tabulka 4** – Použité chemikálie a doba působení.

Příprava vzorků 2. den	
80% aceton	15 min
90% aceton	15 min
95% aceton	15 min
100% aceton	15 min
Pryskyřice + 100% aceton 1:2	1 hod
Pryskyřice + 100% aceton 1:1	1 hod
Pryskyřice + 100% aceton 2:1	1 hod
Pryskyřice	24 hod

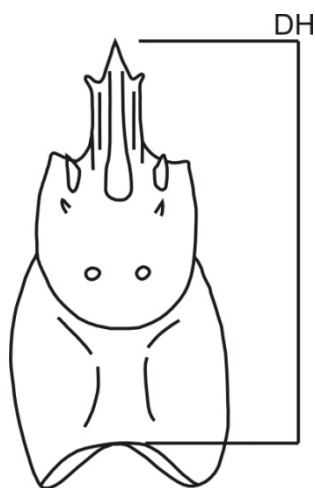
Třetí den zpracování byla ze vzorků pipetou odsáta pryskyřice. Pomocí pinzety se jednotlivé části vzorků vyjmuly ze zkumavek a vložily do gumových forem. Jednotlivé formy byly naplněny pryskyřicí a polymerizovány v termostatu po dobu 24 hodin na tzv. beamkapsle. Polymerizované vzorky byly nadále zpracovány specializovanými odborníky laboratoře elektronové mikroskopie. Zpracování spočívalo v ultratenkém řezání vzorků za pomoci ultramikrotomu (Příloha 12). Jednotlivé řezy vzorků byly umístěny na měděné mřížky určené k pozorování na transmisním elektronovém mikroskopu. Pozorování vzorků proběhlo, po 14 dnech od jejich zpracování, na transmisním elektronovém mikroskopu operujícím na rozhraní 80 kV (Příloha 13, Příloha 14). K prohlížení a fotografování vzorků byl použit software Olympus Micro Image verze 4.0.1 určený pro operační program Windows.

## 4.3. Elektrostimulace raků

### 4.3.1. Postup experimentů

V rámci práce zaměřené na elektrostimulaci a opakovanou elektrostimulaci u raků byly provedeny celkem čtyři experimenty na různých druzích raků. Postup manipulace, měření a elektrostimulace samců raků byl u všech experimentů podobný, včetně použitého střídavého napětí k vyvolání elektrického stimulu. Pro provedení elektrostimulace byl použit přístroj na střídavý proud AC250K2D od firmy Diametral s připojenými elektrodami. Jednalo se o stejný přístroj, který byl použit u předešlých výzkumů elektrostimulace.

Většina samců byla pro účely experimentů držena v chovných nádržích nebo akváriích na „Modelu“. Samci byli pro jednotlivá měření přeneseni ve vaničce s vodou (stejná teplota a chemismus vody jako v nádrži) do laboratoře na „Modelu“. V laboratoři byla připravená druhá vanička, aby nedocházelo k chybám (např. vystavení některých samců elektrostimulaci vícekrát během jednoho dne) při elektrostimulaci. Samci byli jednotlivě změřeni. U samců se měřila délka hlavohrudi a hmotnost z důvodu jejich lepší evidence a pozdějším rozpoznání samců. Délka hlavohrudi (měří se od začátku rostra až po konec hlavohrudi, Obr.7) se měřila pomocí posuvného měřidla s přesností na jedno desetinné místo. Hmotnost samců byla zjišťována pomocí digitální váhy s přesností na desetiny gramu.



**Obr. 7** – Perokresba krunýře s vyznačením měření délky. DH – délka hlavohrudi raka

Experiment bylo zapotřebí vykonávat s pomocí dalšího proškoleného pracovníka, který vždy fixoval samce tak, aby zpřístupnil ventrální stranu samce. Druhý pracovník pak obsluhoval zařízení na střídavý proud a dvojici elektrod (Příloha 6).

Dvojice elektrod byla přiložena na bázi pátého páru kráčivých nohou samců v oblasti gonoporů (Obr.8). Bylo zapotřebí, aby se elektrody dotýkaly citlivých částí samce. Pokud by byla jedna nebo obě elektrody umístěny na chitinovém krunýři raka, nebude mít elektrostimulace daný účinek. V případě negativní odezvy byl výsledek zaznamenán a samec odložen do vaničky.



**Obr.8** – Přiložené elektrody k základu pátého páru pereopodů (Kubec, 2012).

Při pozitivní odezvě na elektrostimulaci byl zaznamenáván počet vypuzených spermatoforů a zda byli vypuzeny z levého nebo z pravého gonoporu. U experimentů zaměřených na opakovanou elektrostimulaci byli samci vystaveni elektrickému stimulu vícekrát s minimálně 7denními intervaly. Samci v experimentech č. 3 a č. 4 byli vystaveni elektrickému stimulu pouze v daný den experimentu.

Většina měření v rámci experimentu elektrostimulace u raků byla prováděna v laboratořích, které jsou součástí VÚRH ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod JU v Českých Budějovicích. Výjimka u experimentů byla pouze jedna, a to v místě provedení elektrostimulace.

## 4.3.2. Design experimentů

### 4.3.2.1. Experiment č. 1 – opakovaná elektrostimulace raka signálního

Experiment opakované elektrostimulace samců druhu raka signálního byl proveden v období páření tohoto druhu. Jednalo se o sérii opakování elektrostimulace s cílem ověřit, zda druh raka signálního je schopen v období páření vypuzovat spermatofoxy opakovaně. V rámci tohoto experimentu byl také zjišťován průměrný počet vytlačených spermatoforů na jednoho samce.

Samci raka signálního byli dlouhodobě drženi v nádržích v laboratoři Experimentálního rybochovného zařízení VÚRH ve Vodňanech. Jednalo se o retenční nádrž s průtočným systémem. Teplota vody v nádrži kolísala dle klimatických podmínek prostředí a je zaznamenána pro každý den měření. Samci raka signálního byli podrobeni elektrostimulaci celkem čtyřikrát (1. října 2012; 17. října 2012; 31. října 2012 a 21. listopadu 2012). Opakované elektrostimulaci bylo celkem vystaveno 27 samců raka signálního. Každý samec raka signálního byl jednotlivě změřen a vážen z důvodu jejich pozdější evidence (Tabulka 5). K opakované elektrostimulaci bylo vždy použito napětí 15 V. Při posledním měření dne 21. listopadu 2012, byly získané spermatofoxy váženy na laboratorní váze pro zjištění průměrné hmotnosti jednotlivých spermatoforů získaných elektrostimulací.

**Tabulka 5** – Biometrika druhu raka signálního zařazeného do experimentu č. 1.

Číslo raka	DH (mm)	V (g)	Pozn.
1	53,5	44,5	
2	59,8	75,7	
3	59,3	74,2	
4	57,7	64,5	
5	58,5	56,7	
6	59,2	76,1	Vs
7	54,1	45,4	
8	56,4	55,6	
9	58,9	58,6	
10	56,7	50,9	
11	58,3	46,2	Vs
12	56,9	58,7	
13	55,1	52,6	Vs
14	51,8	41,6	
15	49,3	35,0	
16	57,5	64,8	
17	50,3	35,3	
18	51,2	37,9	Vs
19	55,3	48,4	
20	50,1	38,6	Vs
21	57,4	44,3	
22	49,6	37,9	
23	52,7	42,9	
24	47,7	36,3	
25	41,5	25,0	
26	44,0	25,4	
27	42,5	23,5	

DH – délka hlavohrudi v milimetrech; V – váha raka v gramech; Vs –vážení spermatoforů

Po ukončení experimentu opakované elektrostimulace druhu raka signálního bylo náhodně vybráno 5 samců (Tabulka 6) ke zjištění gonadosomatického indexu (GSI) po elektrostimulaci. Aktivita samců byla utlumena pomocí anestezie zmražením na ledu. Po uplynutí 10 minutové anestezie byli vybraní jedinci podrobeni pitvě. Při pitvě byl pozorován také stav vyprázdnění varlat a chámovodů, které byly po pitvě váženy a porovnávány s hmotností jedinců.



**Tabulka 6** – Biometrika druhu raka signálního podrobeného pitvě v experimentu č. 1.

Číslo raka	DH (mm)	V (g)
4	57,7	64,5
5	58,5	56,7
9	58,9	58,6
10	56,7	50,9
14	51,8	41,6

DH – délka hlavohruď v milimetrech; V – váha raka v gramech

#### **4.3.2.2. Experiment č. 2 – elektrostimulace raka říčního a raka bahenního**

U druhu raka říčního a raka bahenního proběhla měření v období páření. Experiment elektrostimulace byl zaměřen na možnost opakovaného získávání spermatoforů od raků, kteří byli chováni společně se samicemi, a již došlo se samicemi ke spáření.

Experiment proběhl v laboratoři Genetického rybářského centra, které je součástí VÚRH ve Vodňanech. Tento experiment probíhal současně s pozorováním období páření raků. Elektrostimulaci byli vystaveni pouze samci z nádrží, kde již proběhlo spáření se samicemi. Samci byli také odebíráni pouze z nádrží, kde byly samice stejného druhu jako samci (Tabulka 1). V rámci měření dne 26. října 2012 a 9. listopadu 2012 proběhla biometrika raků a elektrostimulaci bylo vystaveno 12 samců raka říčního (Tabulka 7) a 12 samců raka bahenního (Tabulka 8). Jedinci obou druhů byli vystaveni při elektrostimulaci napětí 15 V. Po ukončení experimentů bylo dne 21. listopadu 2012 od každého druhu náhodně vybráno 5 samců, kteří byli podrobeni pitvě. Provedení pitvy probíhalo obdobně jako u druhu raka signálního popsaného v experimentu č. 1. Toto měření mělo za účel zjištění gonadosamotického indexu samců a vyprázdnění varlat a chámovodů po elektrostimulaci. Teplota vody nebyla jakkoli regulována.

**Tabulka 7** – Biometrika druhu raka říčního zařazeného do experimentu č. 2.

Číslo raka	DH (mm)	V (g)	Pozn.
1	58	49	
2	53	45	
3	61	54	
4	54	37	GSI
5	50	35	GSI
6	56	52	GSI
7	53	34	
8	57	48	
9	52	45	GSI
10	55	41	
11	43	28	
12	50	29	GSI

DH – délka hlavohruď v milimetrech; V – váha raka v gramech; GSI – gonadosomatický index

**Tabulka 8** – Biometrika druhu raka bahenního zařazeného do experimentu č. 2.

Číslo raka	DH (mm)	V (g)	Pozn.
1	63	72	GSI
2	64	64	
3	54	51	
4	56	43	
5	56	39	
6	58	44	
7	68	85	GSI
8	66	86	GSI
9	50	27	
10	59	46	GSI
11	55	38	
12	49	28	GSI

DH – délka hlavohruď v milimetrech; V – váha raka v gramech; GSI – gonadosomatický index

#### **4.3.2.3. Experiment č. 3 – elektrostimulace raka říčního**

Experiment probíhal 25. října 2012 v rámci cvičení z předmětu Chov raků. Experiment byl proveden na Šumavě u rybníka Kramata v období přirozeného rozmnožování raka říčního. Tento experiment byl zaměřen na účinnost elektrostimulace, mimo laboratorní podmínky, u jedinců raka říčního odchycených v přírodní lokalitě. Během tohoto cvičení byli studenti FROV JU seznámeni s metodou elektrostimulace a byl proveden vlastní experiment. Raci byli odchyceni z přírody pomocí ručního odchyty. Nejprve byly na hrázi nastraženy nástrahy, které měly sloužit k nalákání raků. Jednalo se o zmražené rybí hlavy, kterými byla protažena cca půlmetrová rovná větev. Tímto způsobem bylo možné uchytil návnadu u dna.

Návnady byly pravidelně kontrolovány a raci, kteří se dostali do jejich blízkosti, byli ručně odchyceni. Celkem bylo odchyceno cca 23 raků, v tomto počtu bylo ovšem pouze 15 samců. Samice byly opatrně opět vypuštěny do lokality bez dalšího měření. Samci byli změřeni (Tabulka 9) a vystaveni elektrostimulaci o napětí 15 V. Teplota vody v rybníce byla 12,3 °C. Po ukončení experimentu byli samci opět vypuštěni do volné přírody.

**Tabulka 9** – Biometrika raka říčního zařazeného do experimentu č. 3.

Číslo raka	DH (mm)
1	51
2	51
3	48
4	51
5	49
6	49
7	48
8	42
9	42
10	43
11	47
12	44
13	46
14	44
15	40

DH – délka těla v milimetrech

#### **4.3.2.4. Experiment č. 4 – elektrostimulace raka pruhovaného**

Poslední experiment elektrostimulace proběhl 2. října 2012, opět na Experimentálním rybochovném zařízení ve Vodňanech, kde byli samci drženi v nádrži. Raci byli podrobni elektrostimulaci na začátku období prvního páření. Experiment byl zaměřen na ověření funkčnosti elektrostimulace u rodu Cambaridae. Teplota vody nebyla nijak upravována, závisela pouze na přírodních podmínkách. V den experimentu činila 14 °C. Při experimentu bylo měřeno (Tabulka 10) a testováno celkem 26 samců raka pruhovaného. Samci byli podrobni elektrostimulaci při napětí 15 V.

**Tabulka 10** – Biometrika raka pruhovaného zařazeného do experimentu č. 4.

Číslo raka	DH (mm)	V (g)
1	38	15,5
2	34	11,1
3	43	23,5
4	38	13,5
5	39	16,9
6	38	17,1
7	34	11,5
8	29	7,1
9	35	11,6
10	30	6,5
11	29	6,9
12	34	10,1
13	35	11,1
14	30	7,5
15	32	8,6
16	30	7,8
17	27	13,6
18	24	5,1
19	32	8,8
20	31	8,3
21	30	7,2
22	33	10,8
23	30	7,8
24	29	5,9
25	31	8,9
26	25	4,0

DH – délka těla v milimetrech; V – váha raka v gramech

#### 4.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního

Tato část experimentu je uvedena práci pouze okrajově. V mé práci je uvedena z důvodu, že probíhala současně na jedincích, kde bylo pozorováno období páření a kladení vajíček. Experiment hybridizace raka říčního a raka bahenního se zabýval možnostmi vzájemného spáření těchto dvou druhů a možnostmi získání hybridních ráčat v laboratorních podmínkách. Výsledek tohoto experimentu by mohl osvětlit, zda je možný výskyt hybridů těchto dvou druhů ve volné přírodě. V rámci tohoto experimentu byly oba druhy kříženy mezi sebou. Princip hybridizace tak spočíval v přirozeném spáření samců se samicemi pomocí dialelního křížení. Pro kontrolu páření byly vytvořeny skupiny, kde byli samci a samice stejného druhu. Schéma rozdělení samců a samic obou druhů je uvedeno v Tabulce 1 a Tabulce 2.

**Tabulka 11** – Schéma dialelního křížení druhů raka říčního a raka bahenního

	♀ Aa	♀ Al
♂ Aa	♂ Aa × ♀ Aa	♂ Aa × ♀ Al
♂ Al	♂ Al × ♀ Aa	♂ Al × ♀ Al

♂ – samec; ♀ – samice; Aa – rak říční; Al – rak bahenní

## 5. Výsledky

---

### 5.1. Období páření raků

V průběhu obou pozorování bylo zjištěno, že u raků není samotný akt páření závislý na nočních hodinách, neboť bylo páření zaznamenáno i ve dne (Obr. 9). Ze získaných pozorování bylo možné určit, že akt páření raků probíhá nejdéle po dobu 48 hodin nezávisle na denní a noční době nebo druhu raka. Ovšem období páření a kladení vajíček se u různých skupin lišil. Výsledky pozorování páření raků jsou zaznamenány graficky. U všech skupin byly vypočítány průměrné intervaly délky procesů včetně směrodatné odchylky. V průběhu obou pozorování byl zaznamenán úhyn několika samic. Některé samice byly nejspíše usmrceny samci, neboť při kontrolách byly nacházeny oddělená klepeta, pereopody nebo zbytky krunýře hlavohrudi a abdomenu. Na zbylé většině uhynulých samic bylo pozorováno výrazné sekundární zaplísnění způsobené odumíráním vajíček. Na samicích nebylo pozorováno viditelné onemocnění. Všechna pozorování byla zapsána do záznamových listů (Příloha 7 a Příloha 8).

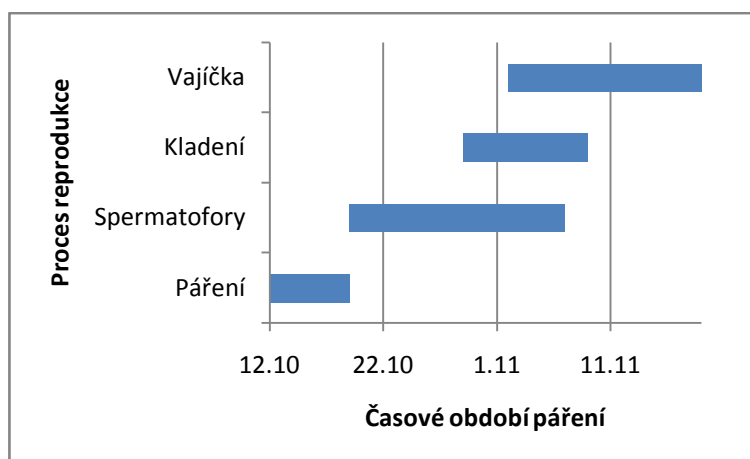


**Obr. 9** – Páření druhu raka říčního.

### 5.1.1. Pozorování období páření raků v roce 2012

#### První skupina

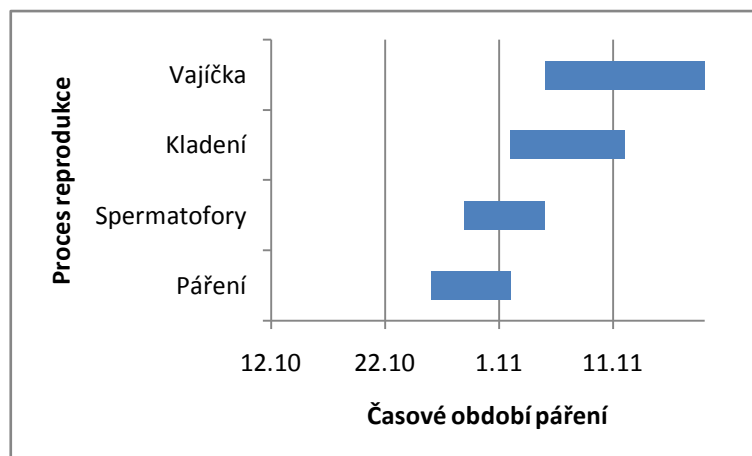
U první skupiny (♂ Aa; ♀ Aa) bylo pozorováno období páření od 12. října do 19. října (rozmezí 7 dní). Samice raků před kladením uchovávaly spermatofoxy na těle v časovém rozmezí od 19. října do 7. listopadu. Samice raka říčního tak uchovávaly spermatofoxy po dobu  $15 \pm 4$  dní. Ke kladení vajíček samicemi docházelo u jednotlivých samic po dobu  $4 \pm 1$  dnů v období od 29. října do 9. listopadu. Nakladená vajíčka bez obalového šlehu byla pozorovatelná již od 2. listopadu. Graf 1.



**Graf 1** – Grafické znázornění období reprodukce u první skupiny raků v roce 2012.

#### Druhá skupina

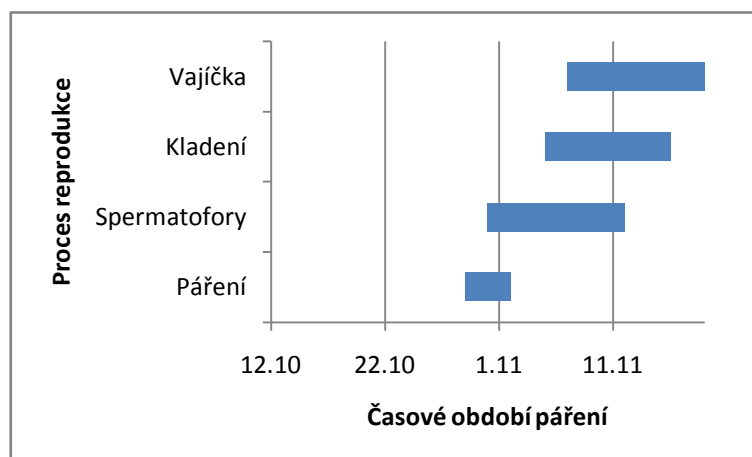
Období páření druhé skupiny (♂ Aa; ♀ A1) probíhalo od 26. října do 2. listopadu v průměru 2 dny. Doba od spáření raků do kladení vajíček trvala  $5 \pm 2$  dní u každé samice. Jednalo se o období od 29. října do 5. listopadu. Proces kladení vajíček u samic trval po dobu  $4 \pm 1$  dnů během období od 2. listopadu do 12. listopadu. Vajíčka byla přichycena na pleopody již od 5. listopadu. Graf 2.



**Graf 2** – Grafické znázornění období reprodukce u druhé skupiny raků v roce 2012.

### Třetí skupina

Třetí skupina raků (♂ Al; ♀ Aa) se pářila od 29. října do 2. listopadu (rozmezí 2 dny). Doba uchování spermatoforů na těle samic byla v průměru  $8 \pm 3$  dní v období mezi 29. říjnem a 5. listopadem. Období do klazení vajíček bylo zaznamenáno od 31. října do 12. listopadu, zatímco samotné klazení probíhalo již od 5. listopadu do 16. listopadu v průměru  $3 \pm 1$  dny. Čistá nakladená vajíčka byla zjištěna u některých samic od 7. listopadu. Graf 3.



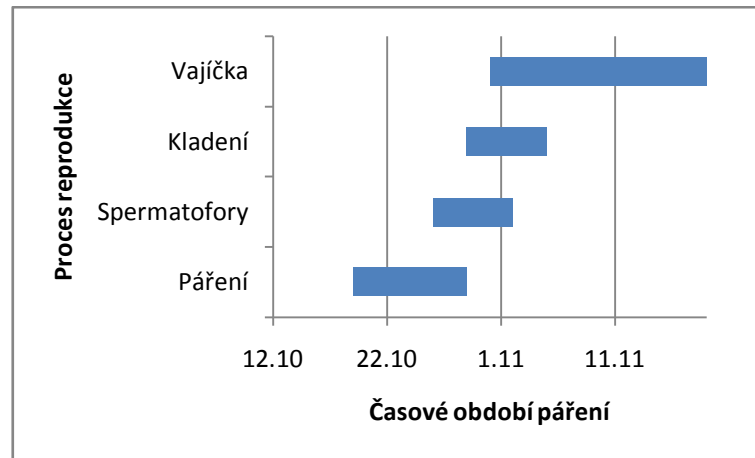
**Graf 3** – Grafické znázornění období reprodukce u třetí skupiny raků v roce 2012.

### Čtvrtá skupina

Období páření u čtvrté skupiny (♂ Al; ♀ Al) bylo zaznamenáno od 19. října do 29. října (interval  $5 \pm 2$  dní) a doba uchování spermatoforů byla  $3 \pm 1$  dny od spáření v období mezi 26. říjnem a 2. listopadem. Proces klazení vajíček probíhal v průměru



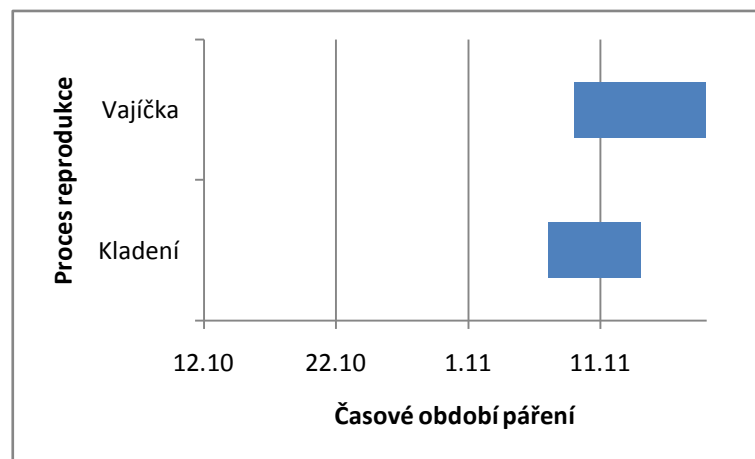
během  $2\pm 1$  dní v období od 29. října do 5. listopadu. Nakladená vajíčka byla viditelná od 31. října. Graf 4.



**Graf 4** – Grafické znázornění období reprodukce u čtvrté skupiny raků v roce 2012.

### Pátá skupina

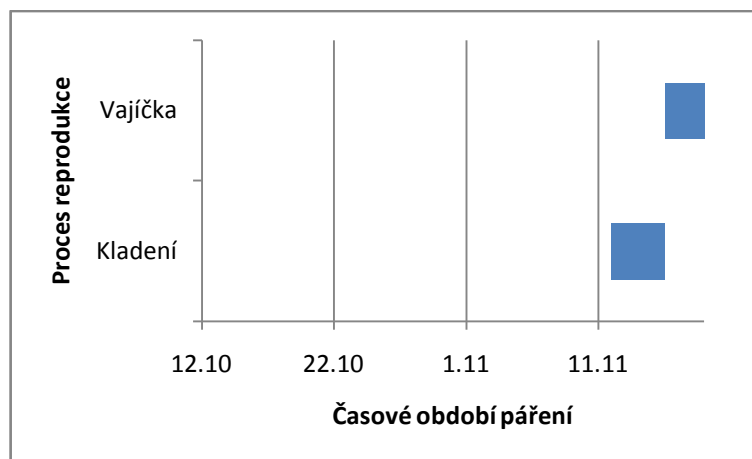
V páté skupině, kde byli pouze samice raka bahenního, došlo ke kladení vajíček i bez přítomnosti samců. Proces kladení vajíček u jednotlivých samic probíhal v průběhu 3 dnů v období od 7. listopadu do 14. listopadu. Graf 5.



**Graf 5** – Grafické znázornění období reprodukce u páté skupiny raků v roce 2012.

## Šestá skupina

Naklazení vajíček bylo dosaženo také u šesté skupiny se samicemi raka říčního. Klazení vajíček samicemi trvalo od 12. listopadu do 16. listopadu v intervalu 4 dnů. Graf 6.

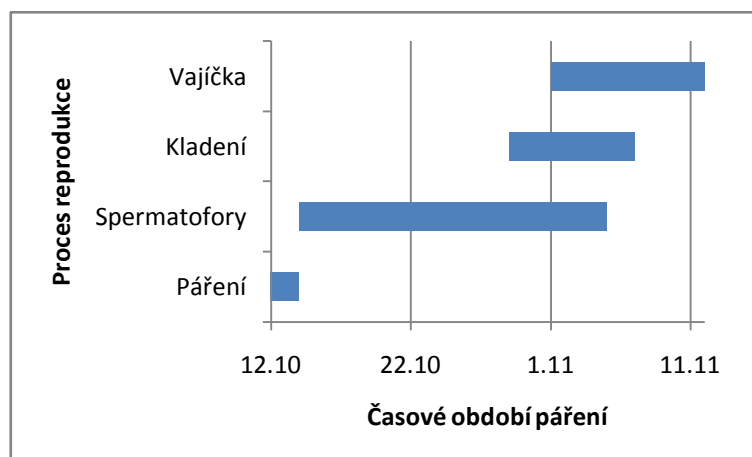


**Graf 6** – Grafické znázornění období reprodukce u šesté skupiny raků v roce 2012.

## 5.1.2. Pozorování období páření raků v roce 2013

### První skupina

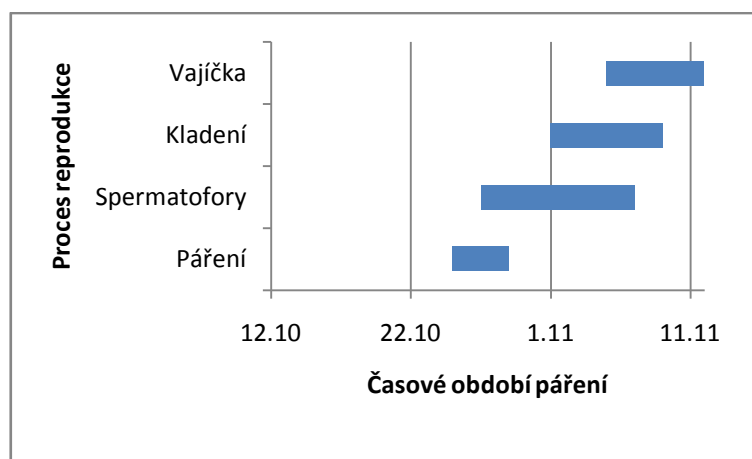
V případě pozorování první skupiny ( $\sigma$  Aa;  $\text{♀}$  Aa) bylo období páření zaznamenáno od 12. října do 14. října v intervalu 2 dní. Spermatofoxy byly na samicích uloženy od 14. října do 5. listopadu v průměru  $13 \pm 4$  dní. Období klazení vajíček probíhalo u raka říčního od 29. října do 7. listopadu v průměru  $2 \pm 1$  dny. Nakladená vajíčka bez obalového šlemu byla pozorovatelná již od 1. listopadu. Graf 7.



**Graf 7** – Grafické znázornění období reprodukce u první skupiny v roce 2013.

### Druhá skupina

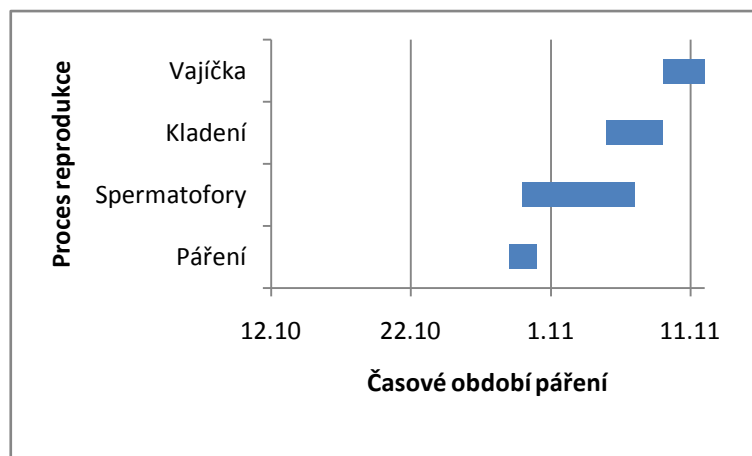
Tato skupina raků (♂ Aa; ♀ Al) se pářila od 25. října do 29. října v průměru 2 dnů. Doba uchování spermatoforů na těle samic probíhala v průměru  $6 \pm 2$  dní. Období do kladení vajíček bylo zaznamenáno od 27. října do 7. listopadu, zatímco samotné kladení probíhalo již od 1. listopadu do 9. listopadu v průměru  $3 \pm 1$  dny. Čistá nakladená vajíčka byla zjištěna u některých samic od 5. listopadu. Graf 8.



**Graf 8** – Grafické znázornění období reprodukce u druhé skupiny v roce 2013.

### Třetí skupina

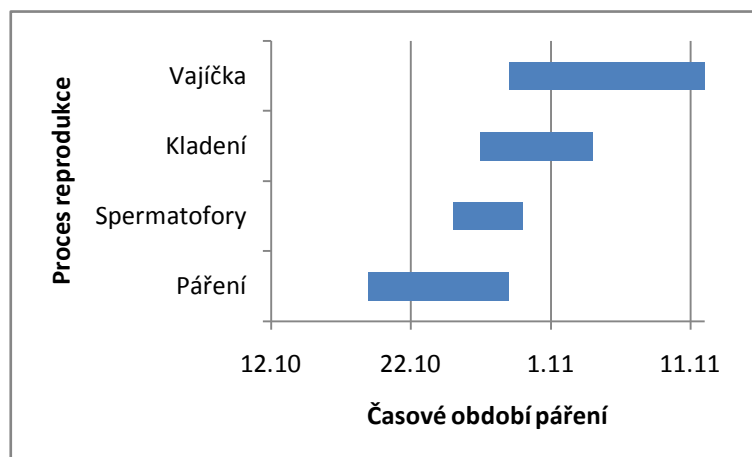
Období páření u třetí skupiny (♂ Al; ♀ Aa) bylo zaznamenáno od 29. října do 31. října (interval 1 den) a doba uchování spermatoforů byla  $6 \pm 1$  dny od spáření v období mezi 25. říjnem a 30. říjnem. Proces kladení vajíček probíhal v průměru během  $3 \pm 1$  dní v období od 5. listopadu do 9. listopadu. Nakladená vajíčka byla viditelná od 9. listopadu. Graf 9.



**Graf 9** – Grafické znázornění období reprodukce u třetí skupiny v roce 2013.

### Čtvrtá skupina

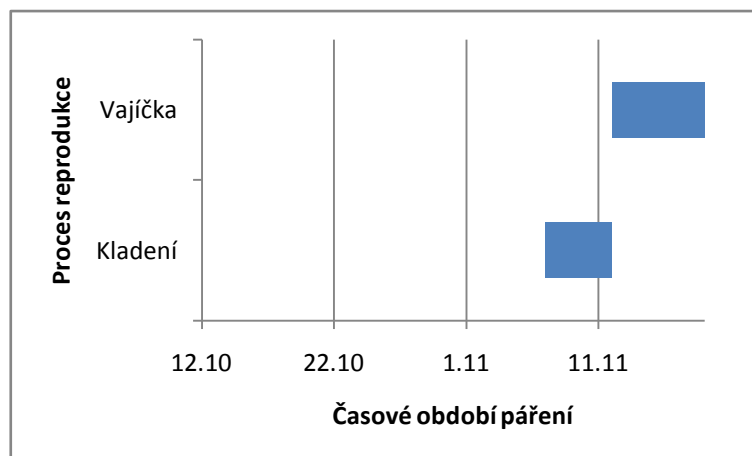
Období páření druhé skupiny (♂ AI; ♀ AI) probíhalo od 19. října do 29. října v průměru  $5 \pm 2$  dní. Doba od spáření raků do kladení vajíček trvala  $2 \pm 1$  dny u každé samice. Jednalo se o období od 25. října do 30. října. Proces kladení vajíček u samic trval po dobu  $3 \pm 1$  dnů během období od 27. října do 4. listopadu. Vajíčka byla přichycena na pleopody již od 29. října. Graf 10.



**Graf 10** – Grafické znázornění období reprodukce u čtvrté skupiny v roce 2013.

### Pátá skupina

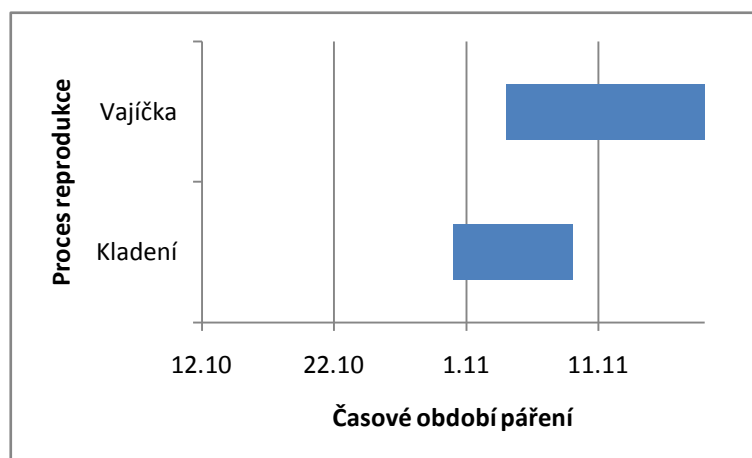
Nakladení vajíček bylo dosaženo u páté skupiny se samicemi raka bahenního (Příloha 27). Kladení vajíček samicemi trvalo od 7. listopadu do 12. listopadu v intervalu  $4 \pm 1$  dnů. Graf 11.



**Graf 11** – Grafické znázornění období reprodukce u páté skupiny v roce 2013.

### Šestá skupina

V poslední skupině, kde byli pouze samice raka říčního, došlo ke kladení vajíček v průběhu 4 dnů v období od 31. října do 9. listopadu (Příloha 26). Přičemž nakladená vajíčka bez obalového šlemu byla viditelná již od 4. listopadu. Graf 12.



**Graf 12** – Grafické znázornění období reprodukce u šesté skupiny v roce 2013.

## 5.2. Výsledky ultrastruktury gamet

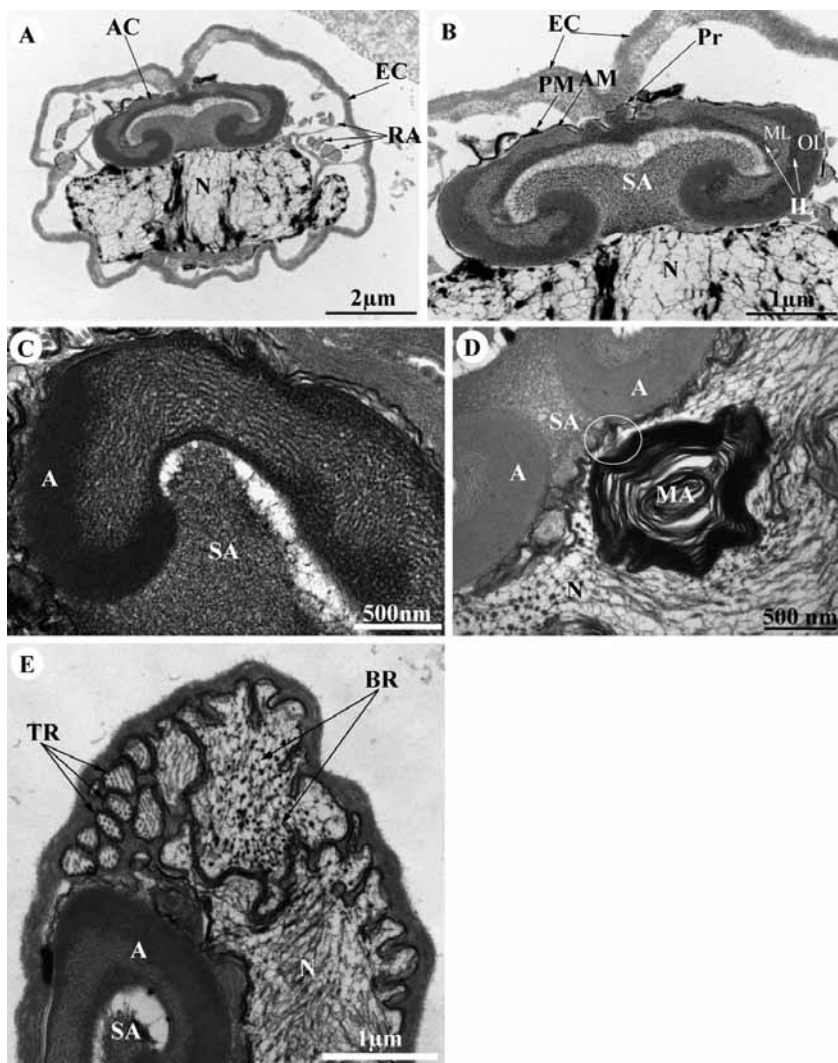
### 5.2.1. Ultrastruktura samčích gamet

Celá buňka spermie je obalena extracelulárním pouzdem. V přední části buňky spermie je viditelný akrozomální komplex (Obr. 10A, 11A, 12A, 13A, 14A), na kterém jsou u raka pruhovaného v přední části přítomny tři až čtyři malé výstupky (Obr. 10B). Na přední části akrozomu spermie raka červeného se nachází hrot, který je připojen světlou elektronovou plošinkou. Průměr hrotu je širší na jeho základně. Světlá elektronová oblast je viditelná i na nejvzdálenějším konci hrotu (Obr. 11A).

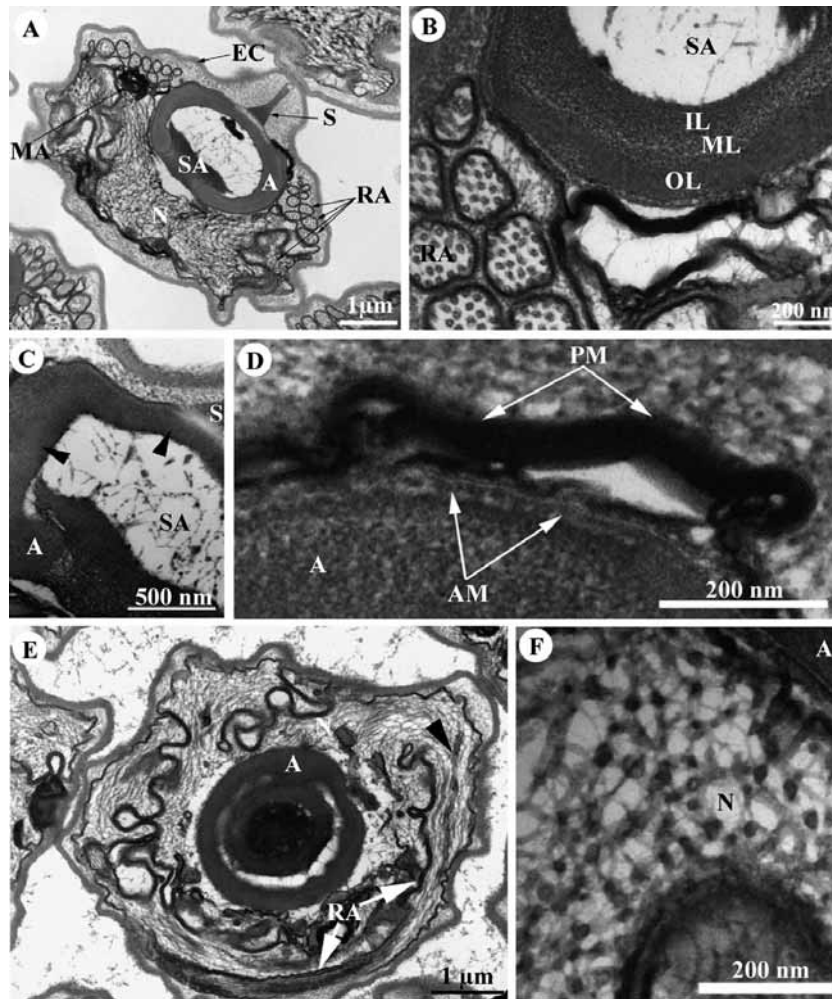
Akrozomální komplex je rozdělen na dvě hlavní části. První část se nazývá akrozom, jedná se o hustou strukturu obráceného miskovitého tvaru, která se skládá z prodloužených souběžných vláken. Obě strany akrozomu jsou symetrické jak laterálně i dorzálně a stáčí se dovnitř, kde vytváří pomocí dvou krátkých ramen prostor tzv. subakrozomální zónu (Obr. 10B, 11A, 12A, 13A, 14A). Akrozom je uspořádán do tří vrstev s odlišnou elektronovou hustotou. Střední vrstva s nízkou elektronovou hustotou se nachází od základny akrozomu až k jeho ramenům. Střední vrstva je obalena vnitřní vrstvou s vyšší elektronovou hustotou. Vnitřní vrstva se rozšiřuje od základny akrozomu směrem k ramenům a vyplňuje jejich hřeben. Vnitřní vrstvu akrozomu lze také pozorovat mezi vrstvou střední a vnější. U čeledi Astacidae je možné pozorovat rovnoběžná vlákna vystupující z přední části akrozomu a tvořící tzv. apikální zónu (Obr. 12A, 13A, 14A). Vnější vrstva je viditelná více na spodní části akrozomu (Obr. 10B, 11B). U čeledi Astacidae je vnější vrstva více viditelná na vrchní části akrozomu (Obr. 12E, 13B, 14B). Subakrozomální zóna tvoří centrální oblast akrozomálního komplexu a je složena z dvou oddělených částí (vnitřní část s vyšší elektronovou hustotou a tenká vnější část s nižší elektronovou hustotou). Samotný akrozomální komplex je obalen plazmatickou membránou a pod ní je akrozomální membrána s nižší elektronovou hustotou (Obr. 10B, 11D, 13E, 14B). U těchto membrán někdy dochází ke spojení s membránovitou lamelou na spodní nebo boční straně akrozomálního komplexu (Obr. 10D, 13E).

Z každé strany akrozomálního komplexu a jádra jsou viditelná radiální ramena o různých průměrech (Obr. 10A, 11A, 12A, 13 A, 14A). Každé rameno je složeno z obalu vyplněným náhodným množstvím souběžných mikrotubulů. Na základně radiálních ramen jsou známky jejich průniku z jádra a obepínají buňku spermie. Jádro

je umístěné v zadní části spermie pod akrozomálním komplexem a je ohraničeno jaderným obalem a plasmatickou membránou. V jaderné plasmě v propojení chromatinových vláken je možné pozorovat osmotické granulomy. U žádné pozorované spermie nebyly zjištěny cytoplasmatické orgány, jako jsou centrioly a mitochondrie.

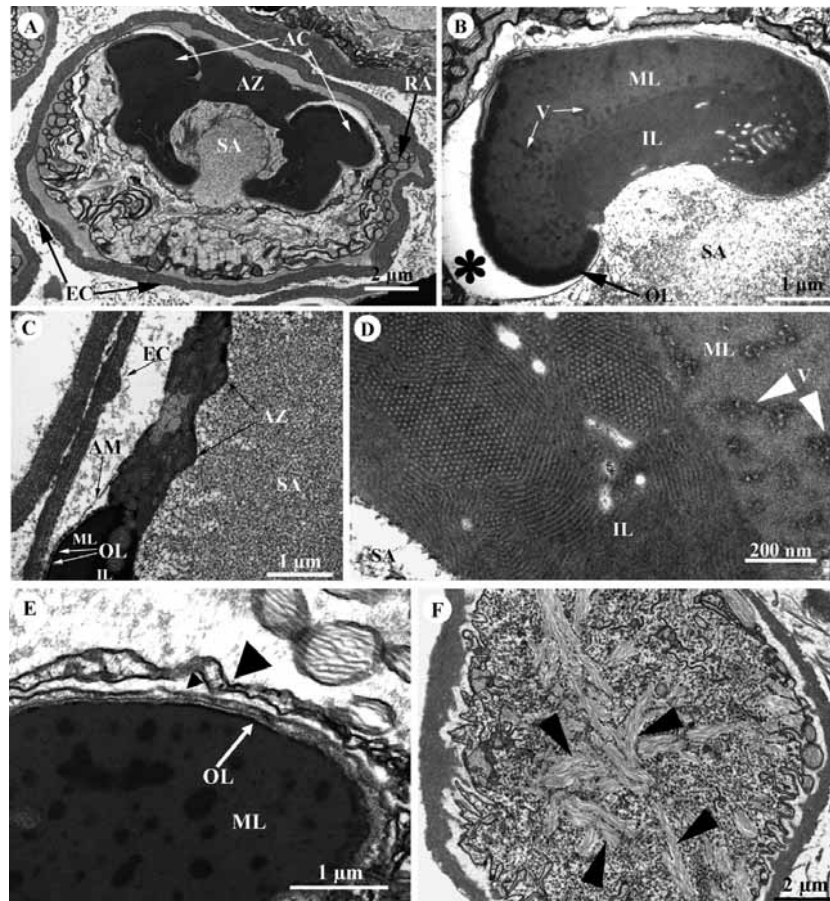


**Obr. 10** – Ultrastruktura spermie raka pruhovaného. (A) podélný rovnoběžný řez rovinou těla spermie, (B) akrozomální komplex, (C) vlákna uvnitř akrozomu, (D) kruh ukazuje spojení mezi plasmatickou membránou a membránovitou lamelou, (E) průnik chromatinových vláken z jádra v základu radiálních ramen; A – akrozom, AC – akrozomální komplex, AM – akrozomální membrána, BR – základ radiálních ramen, EC – extracelulární pouzdro, IL – vnitřní vrstva akrozomu, MA – membránovitá lamela, ML – střední vrstva akrozomu, N – jádro, OL – vnější vrstva akrozomu, PM – plasmatická membrána, Pr – výstupek, RA – radiální ramena, SA – subakrozomální zóna, TR – vrchol radiálních ramen. (Foto: Niksirat, H., 2013a, převzato).

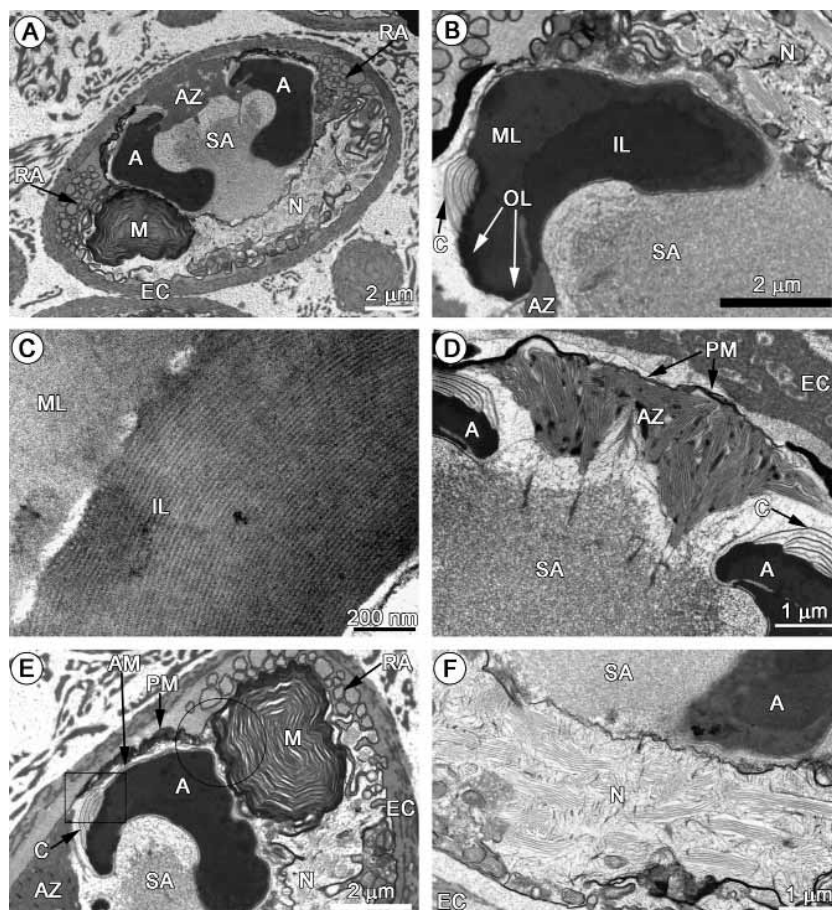


**Obr. 11** – Ultrastruktura spermie raka červeného. (A) podélný rovnoběžný řez rovinou těla spermie, (B) rozdílné vrstvy akrozomu, (C) vlákna uvnitř akrozomu, (D) akrozomální membrána, (E) chromatinová vlákna rozšiřující se do základu radiálních ramen, (F) jádro; A – akrozom, AC – akrozomální komplex, AM – akrozomální membrána, EC – extracelulární pouzdro, IL – vnitřní vrstva akrozomu, MA – membránovitá lamela, ML – střední vrstva akrozomu, N – jádro, OL – vnější vrstva akrozomu, PM – plasmatická membrána, RA – radiální ramena, S – hrot, SA – subakrozomální zóna, (Foto: Niksirat, H., 2013a, převzato).

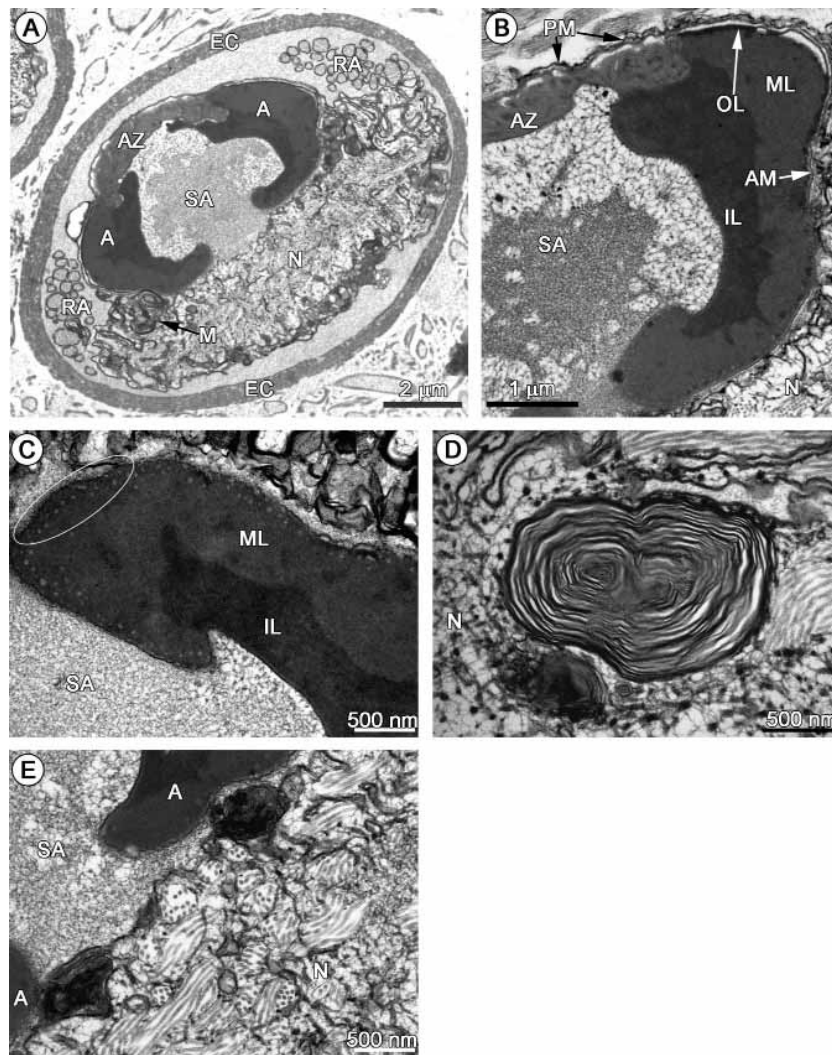




**Obr. 12** – Ultrastruktura spermie raka bahenního. (A) podélný rovnoběžný řez rovinou těla spermie, (B) rozdílné vrstvy akrozomu, (C) apikální zóna, (D) prodlužující se vlákna z apikální zóny do vnitřní vrstvy akrozomu, (E) akrozomální membrána, (F) jaderné části včetně chromatinových vláken; AC – akrozom, AM – akrozomální membrána, AZ – apikální zóna, EC – extracelulární pouzdro, IL – vnitřní vrstva akrozomu, ML – střední vrstva akrozomu, N – jádro, OL – vnější vrstva akrozomu, RA – radiální ramena, SA – subakrozomální zóna, V – váček. (Foto: Niksirat, H., 2013a, převzato).



**Obr. 13** – Ultrastruktura spermie raka říčního. (A) podélný rovnoběžný řez rovinou těla spermie, (B) rozdílné vrstvy akrozomu, (C) vlákna uvnitř vnitřní vrstvy akrozomu, (D) apikální zóna, (E) spojení membránové lamely a plasmatické membrány označené kruhem, spojení plasmatické membrány a akrozomální membrány označené obdélníkem, (F) jádro; A – akrozom, AM – akrozomální membrána, AZ – apikální zóna, C – zakřivené struktury, EC – extracelulární pouzdro, IL – vnitřní vrstva akrozomu, M – membránovitá lamela, ML – střední vrstva akrozomu, N – jádro, OL – vnější vrstva akrozomu, PM – plasmatická membrána, RA – radiální ramena, SA – subakrozomální zóna. (Foto: Niksirat, H., 2013b, převzato).

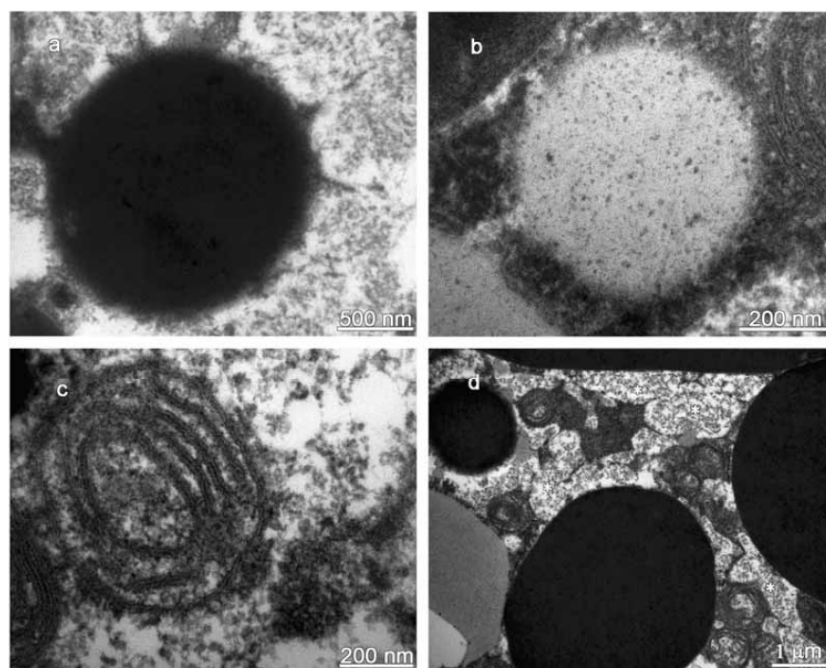


**Obr. 14** – Ultrastruktura spermie raka signálního. (A) podélný rovnoběžný řez rovinou těla spermie, (B) rozdílné vrstvy akrozomu, (C) elektronové jasné póry v základu akrozomu, (D) membránovitá lamela, (E) jádro; A – akrozom, AM – akrozomální membrána, AZ – apikální zóna, EC – extracelulární pouzdro, IL – vnitřní vrstva akrozomu, M – membránovitá lamela, ML – střední vrstva akrozomu, N – jádro, OL – vnější vrstva akrozomu, PM – plasmatická membrána, RA – radiální ramena, SA – subakrozomální zóna. (Foto: Niksirat, H., 2013b, převzato).

## 5.2.2. Ultrastruktura samičích gamet

### Ultrastruktura kortikálních váčků:

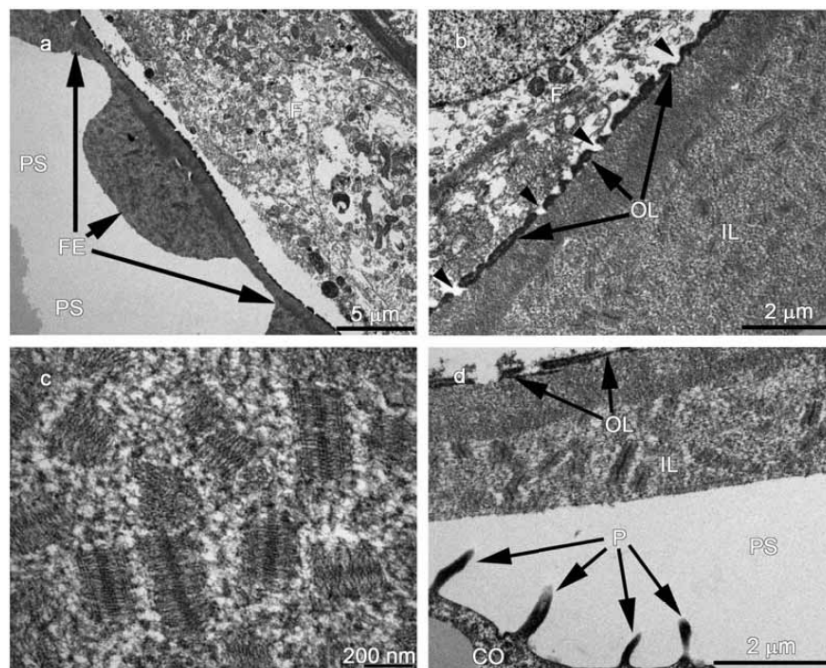
Kůra ovariálního oocyty obsahuje celkem tři typy váčků s různou elektronovou hustotou. U váčků s vysokou a střední elektronovou hustotou jsou pozorovatelné různé velikosti (Obr. 15a, b). Ve struktuře váčků se střední elektronovou hustotou jsou viditelné malé částice s vysokou elektronovou hustotou (Obr. 15b). Tato část oocyty obsahuje rovněž rozptýlené vícevrstevné váčky se střední elektronovou hustotou (Obr. 15c). V případě, že se nachází oocyty ve vaječniku je prostor mezi různými váčky vyplněn zrnitou matricí (Obr. 15d).



**Obr. 15** – Transmisní elektronová mikroskopie rozdílných váčků v kůře oocyty. (a) váček s vysokou elektronovou hustotou, (b) váček se střední elektronovou hustotou, (c) vícevrstevné váčky, (d) rozdílné typy váčků v kůře oocyty. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).

## Ultrastruktura prvního obalu zralého ovariálního oocyty

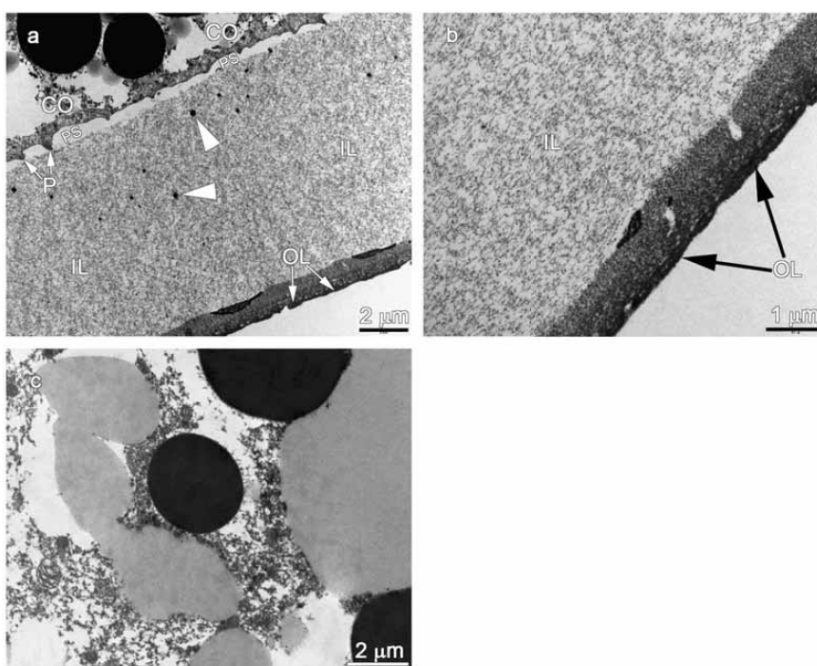
V okolí oocyty se nachází vrstva folikulů. Oocyty jsou pokryty obalem o různých průměrech do tvaru opakující se křivky (Obr. 16a). Podle různých elektronových hustot prvotního obalu oocyty je viditelné rozdělení do dvou vrstev. Vnější vrstva obalu je tvořena materiálem s vysokou elektronovou hustotou a na povrchu obsahuje póry (Obr. 16b). Zatímco vnitřní vrstva obalu obsahuje objekty připomínající kartáče, které se nacházejí uvnitř zrnité matrice (Obr. 16c), mezi prvním obalem a kůrou oocyty se nachází perivitelinální prostor, který obsahuje několik výstupků rozšiřujících se z kůry oocyty (Obr. 16d).



**Obr. 16** – Transmisní elektronová mikroskopie ovariálního oocyty. (a) první obal s rozdílnými průměry a vrstvou folikulů, (b) první obal s póry na vnější vrstvě, (c) vnitřní vrstva prvního obalu, (d) výstupky v kůře oocyty; CO – kůra oocyty, F – vrstva folikulů, FE – první obal, IL – vnitřní vrstva prvního obalu, OL – vnější vrstva prvního obalu, P – výstupky, PS – perivitelinální prostor. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).

## Ultrastruktura prvního obalu čerstvě ovulovaného oocyty

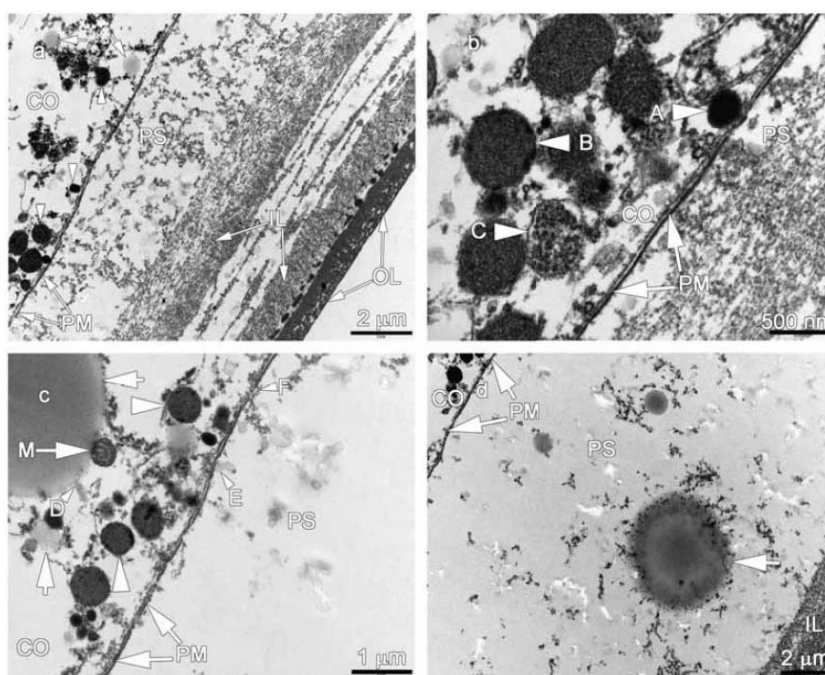
U čerstvě ovulovaného oocyty je pozorovatelný podobný průměr jako jeho prvního obalu. Póry, které se vyskytovaly na povrchu vnější vrstvy obalu, postupně zmizely. V případě vnitřní vrstvy byly kartáčovité útvary nahrazeny houbovitou strukturou. V té je možné pozorovat velmi světlou texturu a v ní rozptýlené granule s vyšší elektronovou hustotou (Obr. 17a, b). Postupně mizí také zrnitá matrice, která vyplňuje prázdný prostor mezi kortikálními váčky (Obr. 17c).



**Obr. 17** – Transmisní elektronová mikroskopie čerstvě ovulovaného oocyty. (a) první obal a kůra oocyty, (b) vnější vrstva a vnitřní vrstva prvního obalu s houbovitou strukturou, (c) mizící zrnitá matrice mezi kortikálními váčky; CO – kůra oocyty, IL – vnitřní vrstva prvního obalu, OL – vnější vrstva prvního obalu, P – výstupky, PS – periviteliní prostor. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).

## Ultrastruktura prvního obalu oocyty hodinu po oplodnění, tvorba druhého pláště

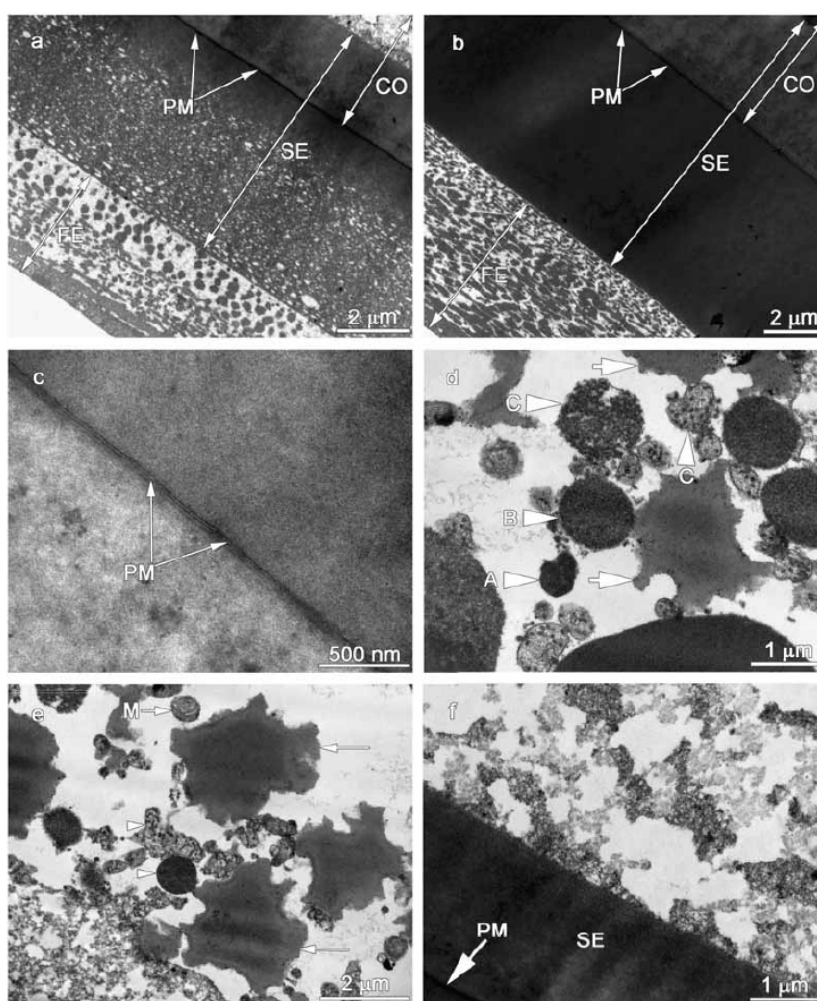
Vnitřní vrstva prvního obalu začala již kondenzovat. Výstupky, které vyčnívaly z kůry oocyty do perivitelinního prostoru již nejsou viditelné (Obr. 18a). Váčky s vysokou elektronovou hustotou se začaly rozpadat a uvolňovat malé husté granulky (Obr. 18b). Podobným způsobem se začaly rozdělovat váčky se střední elektronovou hustotou na menší útvary (Obr. 18c). Prvky s elektronovou hustotou a světlé částice přechází skrz plazmatickou membránu do perivitelinního prostoru. Dochází k vzájemnému smíchání a vytváří se druhý obal oocyty, který je umístěn pod prvním (Obr. 18d).



**Obr. 18** – Transmisní elektronová mikroskopie oocyty jednu hodinu po oplodnění. (a) kondenzace prvního obalu, zmizení výstupků v kůře, kortikální reakce, krátké šipky a šipky se stopkou ukazují váčky s vysokou a střední elektronovou hustotou v kůře oocyty, (b) váčky s elektronovou hustotou v různých stádiích kondenzace, šipky A, B a C ukazují postupný rozpad váčku, (c) šipky a krátké šipky ukazují váčky se střední a vysokou elektronovou hustotou v kůře, krátká šipka D ukazuje místo kde se menší váček se střední elektronovou hustotou odděluje od většího váčku se střední elektronovou hustotou, krátké šipky F a E ukazují místa, kde dochází k přestupu váček s vysokou a střední elektronovou hustotou z plazmatické membrány do perivitelinního prostoru, (d) šipka ukazuje seskupení váček s vysokou a střední elektronovou hustotou v perivitelinním prostoru. CO – kůra oocyty, IL – vnitřní vrstva prvního obalu, M – vícevrstevné váčky, OL: vnější vrstva prvního obalu, PM: plazmatická membrána, PS: perivitelinní prostor. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).

## Ultrastruktura oplozeného obalu a přichytné stopky oocyty po 24 hodinách od oplození

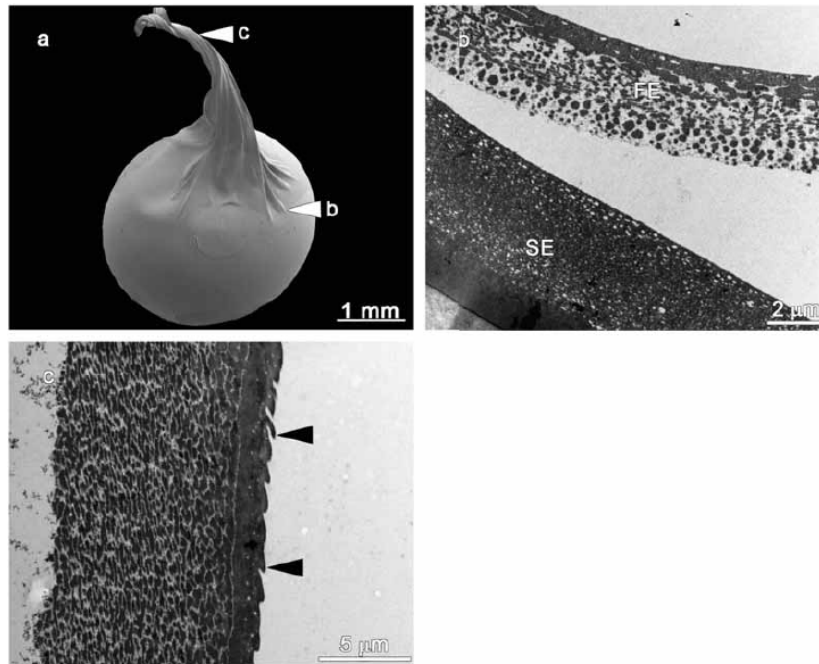
Tloušťka obou vrstev prvního obalu je menší než u ovulovaných oocytů, z důvodu tvorby druhého obalu. Silná vrstva druhého obalu nejprve vypadá jako heterogenní, ale postupně se zhušťuje a vytváří homogenní vrstvu. Druhý obal oocyty byl vytvořen z perivitelinního prostoru a vnější části kůry oocyty (Obr. 19a, b). Na Obr. 19c je možné vidět plazmatickou membránu společně s novou vrstvou. Granulky (uvolněné z váček s elektronovou hustotou) smíchané se světlými částicemi vytvořili druhý obal (Obr. 19d, e, f). Připojovací stopka oocyty vzniká z prvního obalu oocyty (Obr. 20a, b, c).



**Obr. 19** – Transmisní elektronová mikroskopie oocyty po 24 hodinách od oplození. (a) vytvoření druhého obalu v perivitelinním prostoru a část kůry oocyty, (b) plně rozvinutý druhý obal s kompaktní homogenní vrstvou, (c) šipky ukazují plazmatickou membránu uvnitř druhého obalu, (d) šipky a krátké šipky ukazují váčky se střední a vysokou elektronovou hustotou kůry oocyty, šipky A, B a C ukazují postupně se rozpadající váčky s elektronovou



hustotou, (e) v levé dolní části jsou vidět vnitřní obsahy vypuštěné z váčků s vysokou a střední elektronovou hustotou, šipky a krátké šipky ukazují váčky se střední a vysokou elektronovou hustotou kůře oocyty, (f) obsahy váčků s vysokou a střední elektronovou hustotou utváří druhý obal; CO – kůra oocyty, FE – první obal, PM – plazmatická membrána, SE – druhý obal. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).



**Obr. 20** – Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie stopky oocyty. (a) plně vyvinutá stopka, šipky odkazují na mikrografie označené písmenem b a písmenem c, (b) oblast, kde se stopka derivuje z prvního obalu, (c) ultrastruktura horní části stopky, šipky označují zoubkovaný okraj na povrchu stopky; FE – první obal, SE – druhý obal. (Foto: Niksirat, H., 2014, převzato).

## 5.3. Elektrostimulace raků

V rámci části diplomové práce zaměřené na elektrostimulaci a opakovanou elektrostimulaci raků byla statisticky zavrhnuta možnost závislosti počtu vytlačených spermatoforů na váze nebo délce jedince raka. Pomocí analýzy regrese byla tato hypotéza dokázána na naměřených hodnotách z experimentu na druhu raka signálního (Tabulka 5). Závislost byla také ověřena pomocí statistického testu a na základě pozorovaných dat bylo při hladině významnosti 95% zjištěno, že počet vytlačených spermatoforů elektrostimulací není závislý na délce samce ( $P = 0,3507$ ) ani na jeho váze ( $P = 0.1231$ ). Příloha 15, Příloha 16.

### 5.3.1. Experiment č. 1 – opakovaná elektrostimulace raka signálního

Experiment opakované elektrostimulace ze všech měření byl úspěšný u všech 27 raků, kdy došlo k vytlačení spermatoforů se spermii alespoň z jednoho gonoporu (Tabulka 13). V případě jednotlivých měření byla úspěšnost elektrostimulace nižší. U měření prováděného dne 1. října 2012 (teplota vody 13,9 °C) byla elektrostimulace úspěšná u 14 z 27 samců (52 %), dne 17. října 2012 (teplota vody 10,5 °C) byly získány spermatofoxy od 23 z 27 samců (85 %). Před měřením dne 31. října 2012 (teplota vody 6,4 °C) byl zjištěn úhyn jednoho samce (evidovaný pod č. 12) a spermatofoxy byly získány od všech zbylých 26 samců (100 %). Při posledním měření (průměrná teplota vody byla 7,5 °C) byly získány spermatofoxy od 20 z 26 samců (77 %). Průměrná úspěšnost elektrostimulace byla stanovena na 78,5 %. U uhynulého raka nebyly zjištěny žádné příznaky onemocnění nebo sekundárního zaplísnění.

**Tabulka 13** – Počty spermatorů získaných elektrostimulací u druhu raka signálního

Č.	1. října		17. října		31. října		21. listopadu		Celkem
	L	P	L	P	L	P	L	P	
1	1	1	2	1	12	11	1	1	30
2	1	22	17	0	13	12	1	0	66
3	0	0	0	0	0	33	0	0	33
4	0	0	0	0	9	6	0	0	15
5	23	20	24	16	12	13	0	0	108
6	10	11	15	13	4	0	33	34	120
7	0	0	4	10	2	0	1	4	21
8	0	0	23	23	15	15	4	2	87
9	24	24	8	9	17	16	3	5	106
10	10	9	2	6	17	3	1	1	49
11	0	0	8	5	6	5	30	31	85
12	13	13	19	18	-	-	-	-	63
13	17	12	14	7	11	10	14	14	86
14	11	14	0	0	1	0	15	15	56
15	0	0	5	5	2	7	1	1	21
16	0	0	9	3	1	1	0	0	14
17	0	0	5	8	1	0	6	3	23
18	29	30	27	27	19	18	16	15	169
19	0	0	0	2	11	7	4	1	25
20	18	19	13	14	17	18	12	16	127
21	0	0	9	9	16	16	5	0	55
22	0	0	0	0	19	20	1	2	42
23	11	5	14	12	9	6	0	0	57
24	17	11	6	19	5	3	12	3	76
25	0	0	8	8	1	0	2	1	20
26	0	0	4	12	5	0	0	0	34
27	5	3	14	11	13	8	4	3	61

Č. – číslo raka; L – levý gonopor; P – pravý gonopor

Počet spermatorů získaných u obou gonoporů se pohyboval od 14 kusů až po nejvyšší hodnotu 169 kusů spermatorů. Průměrný počet vytlačených spermatorů v experimentu vycházel 66 kusů spermatorů na jednoho samce. Výsledky vážení elektrostimulací získaných spermatorů jsou zapsány v Tabulce 14. Průměrná váha jednoho spermatoru vytlačeného pomocí metody elektrostimulace činí 0,00077 gramů.

**Tabulka 14** – Hmotnosti spermatorů

Číslo raka	Počet spermatorů		Vs (g)	Vps (g)
	L	P		
6	33	34	0,050	0,000746
11	30	31	0,048	0,000107
13	14	14	0,020	0,000725
18	16	15	0,026	0,000829
20	12	16	0,022	0,000779

L – levý gonopor; P – pravý gonopor; Vs – váha spermatorů v gramech; Vps – váha jednoho spermatoru v gramech

Gonadosomatický index od náhodně vybraných samců byl v průměru 1,1 % (Tabulka 15). Při pitvě prvního samce byla zjištěna přítomnost samčích i samičích pohlavních orgánů. Samec byl zaevidován jako hermafrodit a vyřazen z měření gonadosomatického indexu. U ostatních raků byl určen gonadosomatický index bez dalších komplikací. Vizuální zhodnocení stavu varlat a chámovodů prokázalo, že gonády jsou vyplněny spermatofoři se spermiemi.

**Tabulka 15** – Gonadosomatický index druhu raka signálního v experimentu č. 1.

Číslo raka	Vg (g)	GSI index (%)	Poznámka
4	2,4585	–	Hermafrodit
5	0,6933	1,23	Plné
9	0,6490	1,09	Plné
10	0,5685	1,06	Plné
14	0,4297	1,05	Plné

Vg – váha gonád v gramech; GSI index – gonadosomatický index v procentech

### 5.3.2. Experiment č. 2 – elektrostimulace raka říčního a raka bahenního

Elektrostimulace samců raka říčního, chovaných společně se samicemi, provedená na 12 jedincích vykazovala nulové hodnoty. Z obou měření byl vytlačen pouze jeden spermator dne 26. října 2012 (Tabulka 16).

**Tabulka 16** – Výsledky elektrostimulace druhu raka říčního v experimentu č. 2.

Číslo raka	26. října		9. listopadu	
	L	P	L	P
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	1	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

L – levý gonopor; P – pravý gonopor

Během elektrostimulace druhu raka bahenního, provedené dne 26. října 2012 (teplota vody 11,7 °C), byly spermatofoxy získány, alespoň z jednoho gonoporu, od 6 z 12 jedinců (50 %). V den měření 9. listopadu 2012 (teplota vody 8,9 °C) neproběhlo vytlačení spermatoforů u žádného ze samců. Tabulka 17.

**Tabulka 17** – Výsledky elektrostimulace druhu raka bahenního v experimentu č. 2.

Číslo raka	26. října		9. listopadu	
	L	P	L	P
1	1	1	0	0
2	0	0	0	0
3	7	7	0	0
4	6	4	0	0
5	5	5	0	0
6	4	1	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	1	1	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

L – levý gonopor; P – pravý gonopor

Gonadosomatický index vybraných samců druhu raka říčního by v případě plných gonád činil průměrnou hodnotu 1,9%. Vizuální zhodnocení stavu varlat a chámovodů druhu raka říčního prokázal, že gonády raků jsou ve většině pozorování ze  $\frac{2}{3}$  prázdné (Tabulka 18). Pouze u dvou samců raka říčního byly gonády z  $\frac{1}{2}$  prázdné bez spermatoforů se spermiemi. Gonadosomatický index druhu raka bahenního byl stanoven na 2,1%. U většiny samců byly gonády skoro prázdné bez spermatoforů se spermiemi, pouze u jednoho samce byly gonády plné spermatoforů se spermiemi (Tabulka 19).

**Tabulka 18** – Gonadosomatický index druhu raka říčního v experimentu č. 2.

Číslo raka	Vg (g)	GSI index (%)	Stav gonád
4	0,2468	0,67	$\frac{2}{3}$ prázdné
5	0,3884	1,11	$\frac{1}{2}$ prázdné
6	0,4912	0,95	$\frac{1}{2}$ prázdné
9	0,2122	0,47	$\frac{2}{3}$ prázdné
12	0,2088	0,72	$\frac{2}{3}$ prázdné

Vg – váha gonád v gramech; GSI index – gonadosomatický index v procentech

**Tabulka 19** – Gonadosomatický index druhu raka bahenního v experimentu č. 2.

Číslo raka	Vg (g)	GSI index (%)	Stav gonád
1	0,4870	0,68	<sup>2</sup> / <sub>3</sub> prázdné
7	0,2712	0,32	prázdné
8	0,2600	0,30	prázdné
9	0,4636	1,72	plné
12	0,2290	0,82	<sup>2</sup> / <sub>3</sub> prázdné

Vg – váha gonád v gramech; GSI index – gonadosomatický index v procentech

### 5.3.3. Experiment č. 3 – elektrostimulace raka říčního

Z celkem 15 samců vystavených napětí 15 V vytlačili spermatofovy 4 jedinci (26,7 %) z obou gonoporů (Tabulka 20). Samci, kteří reagovali pozitivně na elektrický stimul, vytlačili průměrně 19 spermatoforů z jednoho gonoporu. Vzhledem k vypuštění samců zpět do lokality nebylo možné sledovat chování nebo úhyn následkem prodělaného experimentu.

**Tabulka 20** – Výsledky elektrostimulace v experimentu č. 3.

Číslo	L	P	Celkem
1	0	0	0
2	20	12	32
3	38	38	76
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	17	18	35
8	0	0	0
9	1	8	9
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

L ← levý gonopor; P – pravý gonopor

#### 5.3.4. Experiment č. 4 – elektrostimulace raka pruhovaného

Experiment elektrostimulace ze dne 2. října 2012, provedený na 26 samcích raka pruhovaného, neprokázal užitečnost elektrostimulace u tohoto druhu. Z 26 jedinců podrobených elektrostimulaci bylo dosaženo získání pouze jednoho spermatoforu. Experiment na samcích raka pruhovaného byl tak ukončen s negativním výsledkem, i přesto, že se jednalo o začátek období prvního páření tohoto druhu. Na racích nebyly žádné viditelné známky prodělané nemoci, infekce nebo poškození. (Tabulka 21).

**Tabulka 21** – Výsledky elektrostimulace v experimentu č. 4.

Číslo raka	L	P
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	1	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0

L ← levý gonopor; P – pravý gonopor

## 5.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního

Výsledky experimentu hybridizace druhu raka říčního a druhu raka bahenního jsou v této práci uvedeny pouze informativně. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že páření těchto dvou druhů v laboratorních podmínkách je možné. K spáření samců se samicemi došlo u všech pozorovaných skupin. Většina pozorovaných samic po spáření nakladla vajíčka a upevnila je na pleopody. Bohužel, postupem času docházelo ke ztrátám vajíček, především vajíček z experimentu hybridizace. Na samicích se také začalo objevovat sekundární zaplísnění od neoplozených vajíček. Toto zaplísnění mělo negativní vliv na zbylá zdravá vajíčka. Tyto problémy se projevily, ale také u kontrolních skupin. V obou případech pozorování hybridizace nebyla dochována vajíčka, u kterých by bylo možné pozorovat, zda dochází k embryonálnímu vývoji ve vajíčkách. Příloha 25.



## 6. Diskuze

---

### 6.1. Období páření raků

Reprodukce raků je velmi ovlivněná životními podmínkami prostředí jednotlivých druhů. Mezi nejdůležitější faktory pro řízení reprodukce raků patří teplota vody a fotoperioda (Taugbøl *et al.*, 1987). Páření raků začíná s poklesem teploty vody a se zkracující se fotoperiodou v podzimním období. Pro začátek páření raků je důležitá i fotoperioda, ale v oblastech s mírným podnebným pásmem je teplota vody hlavním stimulem (Vogt, 2002).

Během pozorování období páření raků byl zaznamenán pokles teploty vody k 11 °C, kdy byla zaznamenána páření u všech skupin raků. Tuto skutečnost potvrzuje i Reynolds (2002), který poukazuje, že páření raků může probíhat již při teplotě vody 10 °C. Ale vzhledem k porovnání jednotlivých termínů páření (Příloha 18, Příloha 19) a výrazným rozdílem teploty vody v roce 2012 a 2013, je třeba poukázat na probíhající páření v přibližném termínu bez vlivu nízké či vyšší teploty. Páření raků skutečně není přesně vázáno na určitou teplotu, jak uvádí (Skurdal a Taugbøl, 2002), ale nižší teplota vody než 10 °C toto období neurýchlí. Podobně páření raků není vázáno na přesný termín (Vogt, 2002), ale dle grafického znázornění sledování reprodukce raků po dvě období (Příloha 17, 18, 19, 20) ukazuje jen nepatrně odlišná období fáze reprodukce při různých teplotách. Je možné, že i v mírných klimatických podmínkách patří k hlavním stimulům páření také fotoperioda. Existuje i možnost, že je páření raků řízeno a regulováno hormonálně, jak uvádí (Vogt, 2002). Neopomenutelný je samozřejmě i vliv feromonů na iniciaci páření (Ingle, 1977).

Při pozorování období páření bylo viditelné, že jednotlivé fáze reprodukčního cyklu neproběhla ve stejně dlouhých intervalech. Skurdal a Taugbøl, 2002 popisuje, že délka reprodukčního cyklu závisí na podmínkách lokalit, v nichž se raci nachází. Podobně má na průběh reprodukce raků významný vliv i individuální proces svlékání krunýře jednotlivých raků. Proto se nepáří všichni raci v populaci najednou, ale dochází k postupnému páření připravených jedinců (Skurdal a Taugbøl, 2002).

Podle Skurdala a Taugbøla (2002) a Vogta, 2002 je pro reprodukci raka říčního charakteristický konec září až první polovina října, kdy teplota vody klesá

pod 12 až 8 °C. Doba páření trvá obvykle 2 až 3 týdny (Skurdal a Taugbøl, 2002; Vogt, 2002). Dle výsledků v mé práci (Příloha 17) je viditelný začátek páření a reprodukce až první polovině října při teplotě vody 11 °C. Celková doba páření nebyla delší než sedm dní. Výsledky v našich podmínkách určily období páření raka bahenního na polovinu až konec měsíce října než jak popisuje Skurdal a Taugbøl (2002). (Skurdal a Taugbøl, 2002) uvádí, že existují rozdíly mezi obdobími páření v rámci celé Evropy. Proto výsledky této práce mohou být uplatněny pouze v našich klimatických podmínkách.

Ke kladení vajíček a jejich upevnění na pleopody samic docházelo v několika dnech po páření raků, jako uvádí Vogt (2002). Toto zdržení se, ale lišilo u různých skupin raků. Samice raka říčního začaly klást vajíčka v průměru 13 dní od spáření, zatímco samice raka bahenního již 2 dny od spáření. Skurdal a Taugbøl (2002) a Vogt (2002) uvádí, možnost ovulace a oplodnění vajíček do několika hodin od spáření. Tato možnost nebyla během mého experimentu zaznamenána u žádné ze skupin. Je ovšem diskutabilní, zda délka pauzy mezi pářením a kladením vajíček je závislá na teplotě vody, jak uvádí Vogt (2002). Výsledky mé práce (Příloha 17, 18, 19, 20) ukazují, že i při výrazně odlišných teplotách vody, byla pauza mezi pářením a kladením podobná. Stejně tak i interval kladení vajíček samicemi.

Woodlock a Reynolds (1988) poznamenávají schopnost samic uvolňovat vajíčka i bez předchozího spáření se samci. Výsledky mé práce vykazují stejný závěr. Během pozorování období páření raků proběhlo u samic raka říčního a raka bahenního ke kladení vajíček za nepřítomnosti samců (Příloha 21, 22). Tyto výsledky, tak mohou potvrdit, jak uvádí Woodlock a Reynolds (1988), že nejdůležitějším stimulem pro kladení vajíček jsou hormonální a abiotické podmínky. Ovšem rozdíl v období u samic raka říčního není objasněný (Příloha 22). V tomto případě se období kladení vajíček výrazně lišila podobně jako teplota vody. V rámci ostatních skupin, ale nebyl podobný rozdíl zaznamenán.

Další významnější rozdíly v jednotlivých fázích reprodukce raků nebyly pozorovány a období se velmi shodovala v obou letech. Ovšem byly pozorovány rozdílné intervaly mezi zkoumanými skupinami. Samotné páření proběhlo nejdříve u druhu raka říčního v první polovině října, zatímco druh raka bahenního se začínal pářit přibližně o sedm dní později. U druhu raka říčního však došlo k delšímu intervalu mezi pářením

a kladením vajíček ( $13 \pm 4$  dnů) než u druhu raka bahenního ( $2 \pm 1$  dny). Tak docházelo u druhu raka bahenního ke kladení vajíček nakonec dříve (konec října) než u druhu raka říčního (konec října až začátek listopadu).

Porovnání se skupinami raků, kde probíhala hybridizace, docházelo ke zpoždění spáření samců se samicemi obou druhů. Nezávisle na hodnotě teploty vody proběhlo páření samců raka říčního a samic raka bahenního na konci měsíce října (Příloha 18). V přibližně stejném období proběhlo také páření samců raka bahenního se samicemi raka říčního (Příloha 19). Je možné, že u raků dochází pomocí feromonů (Ingle, 1977) k vyhledávání samic samci stejného druhu. V případě, že samci nenaleznou samice stejného druhu, jsou přitahováni feromony samic ostatních druhů raků. Důležité je třeba poukázat na především na podobné intervaly délky pauzy mezi pářením a kladením vajíček. Výsledky naznačují, že samice raka říčního spárené se samci raka bahenního zkrátily tuto pauzu skoro na polovinu. Zatímco u druhé skupiny (Příloha 18) se délka období mezi pářením a kladením prodloužila. Pozorování zkrácení a prodloužení délky období mezi pářením a kladením vajíček ukazuje, že na době přechovávání spermatoforů na těle samice mají vliv také samci, se kterými se spářily.

## **6.2. Ultrastruktura gamet**

### **6.2.1. Ultrastruktura samčích gamet**

Byla popsána ultrastruktura spermií druhu raka pruhovaného, raka červeného, raka signálního, raka říčního a raka bahenního. Všechny spermie vykazují podobnosti ve struktuře napříč různými druhy i čeleděmi. Celá spermie je obalena extracelulárním pouzdem stejně jako tvrdí Dudenhausen a Talbot (1983). V přední části spermie se nachází akrozomální komplex, složený z akrozomu a subakrozomální zóny (Vogt, 2002). Výsledky ultrastruktury spermií ukazují rozdělení akrozomu na tři vrstvy, přičemž u čeledi Astacidae je pozorována apikální zóna na přední části akrozomu. Rozdíl mezi čeleděmi je také v různé poloze viditelnosti vnější vrstvy akrozomu. Mezi odlišnostmi můžeme také zařadit hrot u spermie raka červeného. Jádro se nachází u všech spermií v jejich zadní části a obaleno jaderným obalem a plasmatickou membránou.

Beacha Talbot (1987) uvádí, že u čeledi Astacidae a Cambaridae se vyskytují. Tuto skutečnost potvrzuje ultrastruktura spermií. Stejně tak počet těchto ramen, který je druhově specifický Moses (1961). Výsledky pozorování potvrzují studii Beache a Talbota (1987), že radiální ramena jsou složena ze svazků mikrotubulů. U radiálních ramen je také pozorován jejich průnik z jádra. U spermií však nebyly pozorované žádné cytoplazmatické organely, jako jsou centrioly a mitochondrie.

### **6.2.2. Ultrastruktura samičích gamet**

Byla popsána ultrastruktura vajíčka raka říčního ve čtyřech různých fázích aktivace. Výsledky ukázaly, že vajíčka raků jsou obklopena prvním obalu, jehož kůra obsahuje tři typy váčků. Během aktivace byly ve vajíčku pozorovány rozsáhlé morfologické změny. Druhý obal vajíčka je vytvořen kortikální reakcí v perivitelinního prostoru a části kůry vajíčka, přičemž doba kortikální reakce je nejméně 24 hodin. U raka říčního tvoří oplodněnou vrstvu vajíčka první a druhý obal. Tyto obaly jsou utvořeny folikulárními buňkami vaječnicků a kortikální reakcí váčků v kůře oocyty. Výsledky ultrastruktury samičí gamety ukázaly, že upevňovací stopka vajíčka je utvořena z prvního obalu račího oocyty. U aktivace račích vajíček se tak nachází mnoho podobností s humry (Talbot a Goudeau *et al.*, 1988). Při pozorování byla zjištěna velká citlivost čerstvě ovulovaných vajíček a při manipulaci může snadno dojít k jejich poškození. Pro použití ovulovaných vajíček k umělému oplodnění je zapotřebí ponechat vajíčka na těle samice dokud nedojde k vytvrnutí vajíčka. Pozorování tohoto výzkumu popisují základní poznatky o aktivaci vajíček raků a mohou být využity pro rozvoj a zlepšení umělé reprodukce raků.

### 6.3. Elektrostimulace raků

V bakalářské práci Kubec (2012) popisuje experiment elektrostimulace na druhu raka pruhovaného z čeledi Cambaridae. Elektrostimulaci bylo vystaveno celkem 10 samců při napětí 20 V. V tomto experimentu nebylo dosaženo očekávané odezvy od žádného ze samců a experiment byl tak ukončen s negativním výsledkem. Stejného negativního výsledku bylo dosaženo také u mého experimentu s rakem pruhovaných. Při experimentu byl vytlačen pouze jeden spermatofor od celkem 15 samců. Tento jeden spermatofor byl vytlačen nejspíše pomocí mechanického stlačení elektrodou při elektrostimulaci. U každého z 15 samců bylo použito napětí 15 V. Tento experiment, tak potvrdil domněnku, že elektrostimulace zatím nenachází u čeledi Cambaridae uplatnění v získávání spermatoforů.

Kubec (2012) uvádí, ve své předchozí práci, úspěšné ověření užitečnosti elektrostimulace na druhu raka signálního z čeledi Astacidae. Tento experiment byl mimo období páření úspěšný u 9 z 15 samců (60 %). Elektrostimulaci během období páření bylo vystaveno celkem 12 samců a úspěšnost dosáhla 67 %. Úspěšnost uvedená v mé práci se pohybovala kolem 85 %. Výsledky mé práce ukazují na možnost odběru spermatoforů pomocí elektrostimulace po celou dobu podzimního období. Od samců bylo také získáno poměrně velké množství získaných spermatoforů (průměrně 66 kusů). Tento experiment dokázal, že je v budoucnu možné záměrně odebírat pomocí elektrostimulace spermatofoxy se spermii, které by bylo možné krátkodobě nebo dlouhodobě uchovávat a využít k umělému oplodnění samic raků.

Experiment elektrostimulace provedený na druhu raka říčního a raka bahenního ukázal, že odběr spermatoforů od těchto druhů je možný. Samci obou druhů během prvního měření vytlačili pouze několik spermatoforů a při druhém měření nebyly již získány žádné. Podobně až na pár jedinců dopadly výsledky elektrostimulace u raka říčního odchyceného ve volné přírodě. Podle jednotlivých výsledků mé práce můžeme usuzovat, že technika elektrostimulace je pro tyto dva druhy vhodná, ale při páření se samicemi došlo k vyprázdnění chámovodů. Tuto domněnku především potvrzují výsledky samců z volné přírody, kde velmi pravděpodobně, že se všichni samci nespáří se samicemi. Samci raka signálního podrobených elektrostimulaci byli odchováni bez přítomnosti samic. Proto je vhodné, pro účely získávání většího množství spermatoforů chovat samce odděleně od samic.

Při pitvě samců raka signálního byla u jednoho z náhodně vybraných jedinců zjištěna přítomnost samčích i samičích pohlavních orgánů. Již Rudolph (1995a,b) uvádí, že intersexualita byla zjištěna u čeledě Astacidae, především u rodů *Astacus* a *Pacifastacus*. Ale u druhu raka signálního byla intersexualita zjištěna poprvé. Vogt (2002) uvádí, že tyto hermafroditi mají *ovotestes*, takže mohou produkovat spermie a po postupném přechodu ze samce na samici s progresivními změnami v histologii gonád mohou také produkovat vajíčka. Tento jedinec vykazoval morfologickou strukturu samce, ale byly pozorovány i samčí pohlavní vývody na třetím páru pereopodů. Při experimentu elektrostimulace došlo u tohoto samce dokonce k vytlačení spermatoforů.

#### **6.4. Hybridizace druhu raka říčního a raka bahenního**

Dle Hoggera (1988) existuje množství zpráv o mezidruhovém páření raků, ale osud vajíček je neznámý. Výsledek hybridizace tak bývá ve volné přírodě pozorován jen zřídka. Avšak reprodukční interference je možné dosáhnout pomocí mezi druhového páření mezi druhy raků, které jsou příbuzné a mají podobný reprodukční cyklus (Reynolds, 2002). Stempel (1975) zkoušel zkřížit druhy raka říčního a raka signálního. V případě této hybridizace dosáhl spáření dvou druhů a získal vajíčka. U vajíček byl pozorován začátek vývoje, ale 10 týdnů po naklazení ve fázi očních bodů začala vajíčka hynout. Podobného výsledku dosáhl Holdich *et al.* (1995), který zaznamenal ztrátu mezidruhových vajíček z pleopodů během 2 až 4 týdnů.

Furrer *et al.*, (1999) a Jelić *et al.*, (2013) popisují experimenty na spářených samicích druhu raka říčního a raka bahenního. Podobně jako u mého experimentu proběhlo páření mezi oběma druhy raků. Samice obou druhů nakladla vajíčka a připevnila na své pleopody. Postupně docházelo ke ztrátám vajíček z pleopodů a rychlému zaplísnění zdravých vajíček. Jelić *et al.*, (2013) uvádí největší ztráty u samic druhu raka říčního, ale u samic raka bahenního byl zbylých vajíček pozorován jejich vývoj. Zatímco Furrer *et al.*, (1999) a Jelić *et al.*, (2013) získali alespoň juvenilní ráčata od samic raka bahenního spářených se samci raka říčního, v mém experimentu byly ztráty vajíček výrazné také u kontrolních skupin. Nakonec byla u všech skupin 100 % mortalita. Rozdíl v mém experimentu bylo provedení v kontrolovaných podmínkách.

Výsledky experimentů Furrera *et al.*, (1999) a Jeliće *et al.*, (2013), kdy byla získána ráčata po spáření dvou druhů, ukazují pravděpodobnost existenci hybridů ve volných vodách. Výsledky mého experimentu nepřinesly přímá data pro toto tvrzení. O příčině nedochování se embryonálního vývoje lze pouze spekulovat, ale ztráta vajíček i u kontrolních skupin nám ukazuje, že příčina nemusí být hybridizace. Je možné, že ve volných vodách existují faktory pro reprodukci raků, které v kontrolních podmínkách mohou chybět. Ovšem bylo ověřeno vzájemné páření druhu raka říčního a raka bahenního a kladení vajíček samicemi (Příloha 25, Příloha 26). V lokalitách, kde tyto dva druhy vyskytují současně, tak může docházet k mezidruhovému páření.

## 7. Závěr

---

Cílem mé práce bylo zpracovat literární rešerší zaměřenou na problematiku reprodukce raků a charakterizaci procesu páření a kladení u raků včetně vyhodnocení intervalu mezi pářením a kladením. Další součástí mé práce byla laboratorní studie morfologické struktury samčích a samičích gamet. K vedlejším cílům práce byla přidána opakovaná elektrostimulace a hybridizace dvou druhů raků. Z výsledků mé práce lze vyčíst období a intervaly mezi fázemi reprodukce raků. Tyto výsledky mohou v budoucnu pomoci s přesnějšími odběry vzorků nebo pozorováním při vědeckých výzkumech. Také byla ověřena možnost nakladení vajíček samice bez přítomnosti samců. Pomocí provedené laboratorní elektronové mikroskopie byla popsána ultrastruktura samčích a samičích gamet raků. Tyto pozorování tak pomohly k lepšímu pochopení reprodukční biologie raků. Výsledky opakované elektrostimulace nám dokazují, že je možné pomocí této metody odebírat vzorky spermatoforů se spermiemi po celé období reprodukce raků. Takto by bylo možné sbírat dostatečné množství spermatu od raků pro tvorbu račích spermabank. V případě hybridizace došlo ke spáření dvou druhů raků, ale výsledek tohoto experimentu dokázal potřebnost dalšího výzkumu reprodukce raků. Pro přesnější pochopení reprodukce raků je třeba se zaměřit také na vliv teploty a další abiotických faktorů na jednotlivé fáze reprodukce raků.



## 8. Přehled použité literatury

---

- ABDU, U., YEHESEKEL G. a SAGI, A. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2000, **37**, 75–83.
- ANDO, H. a MAKIOKA, T. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*(Girard). *Zoological Science*, 1998, **15**, 893–901.
- BEACH, D. a TALBOT, P. Ultrastructural comparison of sperm from the crayfishes *Cherax tenuimanus* and *Cherax albidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 1987, **7**, 205–218.
- DUDENHAUSEN, E.E. a P. TALBOT. An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*(Dana). *Canadian Journal of Zoology*, 1983, **61**, 182–194.
- ŘURIŠ, Zdeněk, HORKÁ, Ivona a KOZÁK, Pavel. Morfologie a anatomie raků. In: *Biologie a chov raků*, Vodňany: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2013, 179–188. ISBN 978-80-87437-42-1.
- FURRER, S.C., CANTIENI, M. a DUVOISIN, N. Freshly hatched hybrid between *Astacustacus* and *Astaculeptodactylus* differ in chela shape from purebred offspring. In: *Freshwater Crayfish*, 1999, **12**, 90–97.
- HAMR, P. *Orconectes*. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, 585–608.
- HESSEN, D. O., TAUGBØL, T., FJELD, E. a SKURDAL, J. Egg development and life-cycle timing in the noble crayfish (*Astacus astacus*). *Aquaculture*, 1987, **64**, 77–82.
- HOBBS, H. H. Jr., Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. In: *Freshwater crayfish – Biology, Management and Exploitation*. London: Croom Helm, 1988, 52–82.
- HOGGER, J.B. Ecology, population biology and behaviour. In: *Freshwater Crayfish – Biology, Management and Exploitation*. London: Croom Helm, 1988, 114–144.
- HOLDICH, D. M. Background and Functional Morphology. In: *Biology of Freshwater Crayfish*, Oxford: Blackwell Science, 2002, 3–29.
- HOLDICH, D. M. a REEVE, I. D. Functional morphology and anatomy. In: *Freshwater crayfish – Biology, Management and Exploitation*. London: Croom Helm, Portland: Timber press, 1988, 11–51.
- HOLDICH, D.M., READER, J.P., ROGERS, W.D. a HARLIOGLU, M. Interactions between three species of crayfish (*Austropotamobius pallipes*, *Astaculeptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*). *Freshwater Crayfish*, 1995, **10**, 46–56.
- HUNER, J. V. a VAULT, J. W. Jr. The molt cycle of subadult red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Proceedings of the World Mariculture Society*, 1976, **7**, 267–273.
- HUNER, J. V. *Procambarus*. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, 541–584.

- HULÁK, Martin. *Molekulárne základy biológie a genetiky v rybárstve*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 2008, 167 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-81-5.
- INGLE, R. W. Laboratory and SCUBA studies on the behaviour of the freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Report of the Underwater Association, NS*, 1977, **2**, 1–15.
- JELIĆ, Mišel, KLOBUČAR, Goran, BLÁHA, Martin a MAGUIRE, Ivana. Noble crayfish and narrow-clawed crayfish hybridisation experiment in natural habitat. *Book of Abstracts – Regional European Crayfish Meeting CrayCro*, Rovinj, Chorvatsko, 2013.
- JERRY, D. R. Electrical stimulation of spermatophore extrusion in the freshwater yabby (*Cherax destructor*). *Aquaculture*, 2001, **200**, 317–322.
- KLIMENT, Jozef, NOVÁK, Miloslav, ROB, Oldřich, HINTNAUS, Jaroslav, a ŠŤASTNÝ, Pavel. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. 2. přeprac. vyd. Bratislava: Příroda, 1989. 392 s. Živočišna výroba. ISBN 80-07-00027-5.
- KOCOUR, Martin. Genetika kvantitativních znaků u ryb. In: *Genetika a šlechtění ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2013, 123–150. ISBN 978-80-87437-48-3.
- KOODA-CISCO, M. J. a TALBOT, P. A technique for electrically stimulating extrusion of spermatophores from the lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture*, 1983, **30**, 221–227.
- KOZÁK, Pavel, BUŘIČ, Miloš a POLICAR, Tomáš. Studium plodnosti raka pruhovaného (*Orconectes limosus*). In: 55 let výuky rybářské specializace na MZLU v Brně. Brno, 2004, 301–308.
- KOZÁK, Pavel, BUŘIČ, Miloš, POLICAR, Tomáš, HAMÁČKOVÁ, Jana a LEPIČOVÁ, Alena. The effect of inter- and intra-specific competition on survival and growth rate of native juvenile noble crayfish *Astacus astacus* and alien spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*. *Hydrobiologia*, 2007, **590**, 85–94.
- KOZÁK, Pavel, BUŘIČ, Miloš, KOUBA, Antonín, a POLICAR, Tomáš. *Metodika chovu raka říčního*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 2008, 36 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-03-7.
- KOZÁK, Pavel, POLICAR, Tomáš, BUŘIČ, Miloš a KOUBA, Antonín. *Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR*. 2. přeprac. vyd. Metodika, Vodňany: fakulta rybářství a ochrany vod, 2009, **92**, 27 s.
- KROL, R. M., HAWKINS, W. E. a OVERSTREET, R. M. Reproductive components. In: HARRISON, F. W. a A. G. HUMES (Eds). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York: Wiley-Liss, 1992, **10**, 295–343.
- KUBEC, Jan. *Elektrostimulace spermiace u raků*. České Budějovice, 2012. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod.
- LEWIS, S. D. *Pacifastacus*. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, 511–540.

- LÓPEZ-CAMPS, J., BARGOLLO, R., BOZZO, M. G., DURFORT, M., FONTARNAU, R. The spermatogenesis of crustaceans: VII. Review of spermatozoon of the Crayfish *Astacus astacus*. *Gamete Research*, 1981, **4**, 65–82.
- MOSES, M. J. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*): II. Description of stages. *Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology*, 1961, **10**, 301–333.
- NIKSIRAT, Hamid, KOUBA, Antonín, PŠENIČKA, Martin, KUKLINA, Irina a KOZÁK, Pavel. Ultrastructure of spermatozoa from three genera of crayfish *Orconectes*, *Procambarus* and *Astacus*. (DECAPODA: Astacoidea): New findings and comparisons. *Zoologischer Anzeiger*, 2013a, **252**, 226–233.
- NIKSIRAT, Hamid, KOUBA, Antonín, RODINA, Marek a KOZÁK, Pavel. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of three crayfish species: *Austropotamobius torrentium*, *Pacifastacus leniusculus*, and *Astacus astacus*. (DECAPODA: Astacidae). *Journal of Morphology*, 2013b, **274**, 750–758.
- NIKSIRAT, Hamid, KOUBA, Antonín a KOZÁK, Pavel. Egg activation and cortical reaction in the noble crayfish *Astacus astacus*. In: *Biology of reproduction in the crayfish*, 2014, 57–71.
- POLJAROEN, J., VANICHVIRIYAKIT, R., TINIKUL, Y., PHOUNGPETCHARA, I., LINTHONG, V., WEERACHATYANUKUL, W. a SOBHON, P. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Zoologischer Anzeiger*, 2010, **249**, 81–94.
- PONGTIPPATEE, P., VANICHVIRIYAKIT, R., CHAVADEJ, J., PLODPAI, P., PRATOOMCHART, B., P. SOBHON, P. a WITHYACHUMNARNKUL, B. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 2007, **38**, 1635–1644.
- PÖCKL, M. Distribution of crayfish species in Austria with special reference to introduced species. *Freshwater Crayfish*, 1999, **12**, 733–750.
- REYNOLDS, J. D. Growth and reproduction. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, 152–191.
- RUDOLPH, E. H. Partial protandric hermaphroditism in the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 1995a, **15**, 720–732.
- RUDOLPH, E. H. A case of gynandromorphism in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana*, 1995b, **68**, 705–711.
- SAGI, A., KHALAILA, I., BARKI, A., HULATA, G. a KARPLUS, I. Intersex red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, (von Martens): functional males with pre-vitellogenic ovaries. *Biological Bulletin*, 1996, **190**, 16–23.
- SANDIFER, P. a LYNN, J. Artificial insemination of Caridean shrimp. In: *Advances in Invertebrate Reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 1980, 271–288.
- SANDIFER, P. A., LAWRENCE, A. L., HARRIS, S. G., CHAMBERLAIN, G. W., STOKES, A. D. a BRAY, W. A. Electrical stimulation of spermatozoon expulsion in marine shrimp, *Penaeus* Spp. *Aquaculture*, 1984, **41**, 181–187.

- SKURDAL, J. a TAUGBØL, T. Do we need harvest regulations for European crayfish? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, **4**, 461–485.
- SKURDAL, J. a TAUGBØL, T. 2002. *Astacus*. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, 467–510.
- STREMPEL, K.M. Künstliche Erbrütung von Edelkrebsen in Zugerglasern und Vergleichende Beobachtungen im Verhalten und Abwachs von Edel- und Signalkrebsen. *Freshwater Crayfish*, 1975, **2**, 393–403.
- STUCKI, T. P. Life cycle and life history of *Astacuseptodactylus* in Chatzensee Pond (Zürich) and Lake Ägeri, Switzerland. *Freshwater Crayfish*, 1999, **12**, 430–448.
- TALBOT, P. a SUMMERS, R. G. The structure of sperm from *Panulirus*, the spiny lobster, with special regard to the acrosome. *Journal of Ultrastructure Research*, 1978, **64**, 341–351.
- TALBOT, P. a GOUDEAU, M. A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster, *Homarus*. *Gamete Res.*, 1988, **19**, 1–18.
- TAUGBØL, T., WRVÅGEN, S. B., LINLØKKEN, A. N. a SKURDAL, J. Post-molt exoskeleton mineralisation in adult noble crayfish, *Astacus astacus*, in three lakes with different calcium levels. *Freshwater Crayfish*, 1987, **11**, 219–226.
- VASILEVA, P., ZAIKOV, A. a HUBENOVA, T. Investigation on fecundity and eggs size in cultural and natural crayfish population of *Astacuseptodactylus* Esch. in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 2006, **12**, 208–217.
- VOGT, G. Functional Anatomy. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 2002, **53**–151.
- WESTMAN, K., SAVOLAINEN, R. a PURSIANEN, M. A comparative study of the noble crayfish, *Astacus astacus* (L), and the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in a small forest lake in southern Finland. *Freshwater Crayfish*, 1993, **9**, 451–465.
- WOODLOCK, B. a REYNOLDS, J. D. Laboratory breeding studies of freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Freshwater Biology*, 1988, **19**, 71–78.

## 9. Seznam příloh

---

- Příloha 1 – Samec a samice raka říčního (Kozák *et al.*, 2009).
- Příloha 2 – Samec a samice raka bahenního (Kozák *et al.*, 2009).
- Příloha 3 – Samec raka signálního (Kozák *et al.*, 2009).
- Příloha 4 – Samec raka pruhovaného (Kozák *et al.*, 2009).
- Příloha 5 – Samec raka červeného (Kozák *et al.*, 2009).
- Příloha 6 – Elektrostimulace samce raka. (Foto: autor).
- Příloha 7 – Záznamový list z pozorování období páření v roce 2012 včetně teplot vody.
- Příloha 8 – Záznamový list z pozorování období páření v roce 2013 včetně teplot vody.
- Příloha 9 – Rozpůlený květináč sloužící jako úkryt pro raky. (Foto: autor).
- Příloha 10 – Žlaby použité v experimentu období páření v roce 2013. (Foto: autor).
- Příloha 11 – Žlab se štěrkem a úkryty. (Foto: autor).
- Příloha 12 – Ultramikroton. (Foto: autor).
- Příloha 13 – Pořizování mikrofotografií na elektronovém mikroskopu. (Foto: autor).
- Příloha 14 – Elektronový mikroskop. (Foto: autor).
- Příloha 15 – Regresní přímka závislosti počtu spermatoforů na délce raka.
- Příloha 16 – Regresní přímka závislosti počtu spermatoforů na hmotnosti raka.
- Příloha 17 – Grafické znázornění reprodukce první skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 18 – Grafické znázornění reprodukce druhé skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 19 – Grafické znázornění reprodukce třetí skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 20 – Grafické znázornění reprodukce čtvrté skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 21 – Grafické znázornění reprodukce páté skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 22 – Grafické znázornění reprodukce šesté skupiny v roce 2012 a 2013.
- Příloha 23 – Průběh aktu páření v experimentu hybridizace. (Foto: autor).
- Příloha 24 – Samice raka říčního s vajíčky na pleopodech. (Foto: autor).
- Příloha 25 – Vajíčka na samici raka bahenního spárené se samcem raka říčního. (Foto: autor).
- Příloha 26 – Vajíčka na samici raka říčního spárené se samcem raka bahenního. (Foto: autor).
- Příloha 27 – Vajíčka nakladená samicí raka bahenního bez přítomnosti samců. (Foto: autor).

## 10. Přílohy

---



Příloha 1 – Samec a samice raka říčního (Kozák *et al.*, 2009).



Příloha 2 – Samec a samice raka bahenního (Kozák *et al.*, 2009).



Příloha 3 – Samec raka signálního (Kozák *et al.*, 2009).



Příloha 4 – Samec raka pruhovaného (Kozák *et al.*, 2009).



Příloha 5 – Samec raka červeného (Kozák *et al.*, 2009).



Příloha 6 – Elektrostimulace samce raka. (Foto: autor).



Příloha 7 – Záznamový list z pozorování období páření v roce 2012 včetně teplot vody.

Sk.	♂	♀	12. 10.	19. 10.	26. 10.	29. 10.	31. 10.	2. 11.	5. 11.	7. 11.	9. 11.	12. 11.	14. 11.	16. 11.	19. 11.
			10,7 °C	11,8 °C	11,7 °C	7,0 °C	6,4 °C	8,1 °C	9,1 °C	8,3 °C	8,9 °C	9,2 °C	9,3 °C	8,0 °C	7,2 °C
první	Aa	Aa	1p; 3-	4s	4s	3s; 1k	3s; 1k	2s; 1k; 1v	1s; 2k; 1v	1s; 1k; 2v	1k; 3v	4v	4v	4v	4v
	Aa	Aa	2p; 2-	4s	4s	4s	3s; 1k	3s; 1k	2s; 1k; 1v	1s; 1k; 2v	1s; 3v	1s; 3v	1s; 3v	1s; 3v	1s; 3v
	Aa	Aa	4p	4s	4s	2s; 2k	2s; 2k	2s; 2v	2k; 2v	2k; 2v	4v	4v	4v	4v	4v
druhá	Aa	Al	-	3-; 1X	3-	1p; 2-	1p; 1s; 1x	2s	1s; 1k	1s; 1k	1v; 1x	1v	1v	1v	1v
	Aa	Al	-	-	1p; 3-	2p; 1s; 1-	3s; 1p	1s; 3k	1s; 2v; 1x	1k; 2v	3v	3v	3v	3v	3v
	Aa	Al	-	-	-	2p; 2-	1p; 2s; 1-	1p; 3s	4s	2s; 2k	1s; 3k	1s; 3v	1s; 3v	1s; 3v	1s; 3v
třetí	Al	Aa	-	-	-	1s; 3-	1s; 3p	4s	2s; 2k	2s; 2v	2s; 2v	1s; 1k; 2v	1s; 1k; 2v	1s; 3v	1s; 3v
	Al	Aa	-	-	-	3p; 1-	1p; 3s	4s	3s; 1k	2s; 2k	1s; 1k; 2v	1s; 3v	1k; 3v	4v	4v
	Al	Aa	-	-	-	-	2s; 2p	4s	4s	4s	2s; 2k	2v; 2x	2v	2v	1v; 1x
čtvrtá	Al	Al	-	2p; 2-	2p; 2s	2s; 2k	2k; 2v	4v	4v	4v	4v	4v	4v	4v	4v
	Al	Al	-	3p; 1-	3s; 1p	2s; 2k	2k; 2v	1k; 3v	4v	4v	4v	4v	4v	4v	4v
	Al	Al	-	1p; 3-	2s; 1p; 1-	1s; 2k; 1-	1s; 2v; 1-	2v; 1-; 1x	2v; 1-	2v; 1-	2v; 1-	2v; 1-	2v; 1-	2v; 1-	2v; 1-
pátá		Al	-	-	-	-	-	-	-	1k; 3-	3k; 1v	4v	4v	4v	4v
		Al	-	-	-	-	-	-	-	-	4k	4v	4v	4v	4v
		Al	-	-	-	-	-	-	-	-	1k; 3-	1v; 3k	4v	4v	4v
šestá		Aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4k	4k	4v	4v
		Aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4k	4k	4v	4v
		Aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3k; 1-	3k; 1-	3v; 1-	3v; 1-

♂ – samec; ♀ – samice; Aa – rak říční; Al – rak bahenní; p – páření; s – spermatofoxy na samici; k – kladení vajíček; v – nakladená vajíčka; X – úhyn;

- - žádný záznam

Příloha 8 – Záznamový list z pozorování období páření v roce 2013 včetně teplot vody.

			12. 10.	14. 10.	19. 10.	25. 10.	27. 10.	29. 10.	30. 10.	31. 10.	1. 11.	4. 11.	5. 11.	7. 11.	9. 11.	12. 11.
Skupina	♂	♀	10,8 °C	10,9 °C	11,1 °C	10,2 °C	12,8 °C	10,7 °C	10,3 °C	6,3 °C	5,2 °C	9,7 °C	9,0 °C	9,9 °C	6,1 °C	4,0 °C
1	Aa	Aa	5p	5s	5s	5s	5s	3s; 2k	3s; 2k	2s; 3k	2s; 3v	2s; 3v	2k; 3v	5v	5v	5v
2	Aa	Al	-	-	-	2p; 3-	3p; 2s	5s	5s	5s	2s; 3k	1s; 4k	1s; 1k; 3v	1k; 4v	5v	5v
3	Al	Aa	-	-	-	-	-	3p; 2-	3s; 2p	5s	5s	5s	3k; 2s	5k	5v	5v
4	Al	Al	-	-	3p; 2-	3s; 2-	3k; 2p	2s; 3v	2k; 3v	2k; 3v	1k; 4v	5v	5v	5v	5v	5v
5		Al	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3k; 2-	5k	5v
6		Aa	-	-	-	-	-	-	-	3k; 2-	3k; 2-	3v; 2-	2k; 3v	2k; 3v	5v	5v

♂ – samec; ♀ – samice; Aa – rak říční; Al – rak bahenní; p – páření; s – spermatofovy na samici; k – kladení vajíček; v – nakladená vajíčka; X – úhyn;

- - žádný záznam



Příloha 9 – Rozpůlený květináč sloužící jako úkryt pro raky. (Foto: autor).



Příloha 10 – Žlaby použité v experimentu období páření v roce 2013. (Foto: autor).



Příloha 11 – Žlab se štěrkem a úkryty. (Foto: autor).



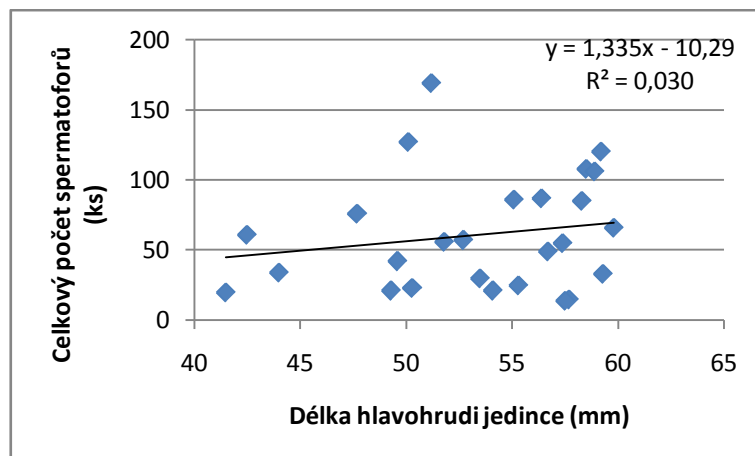
Příloha 12 – Ultramikroton. (Foto: autor).



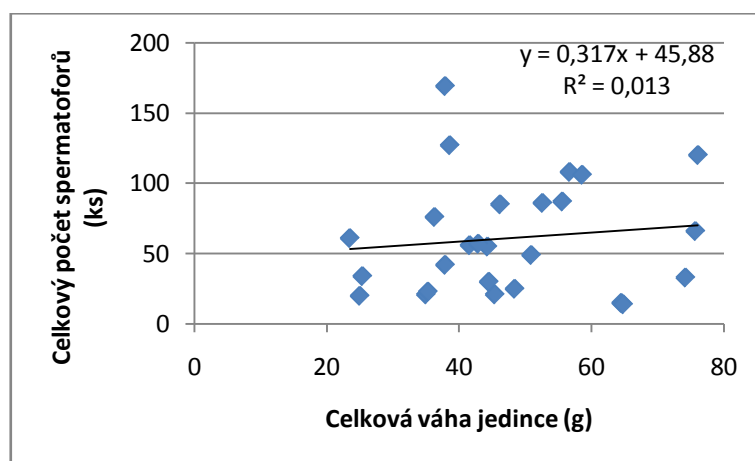
Příloha 13 – Pořizování mikrofotografií na elektronovém mikroskopu. (Foto: autor).



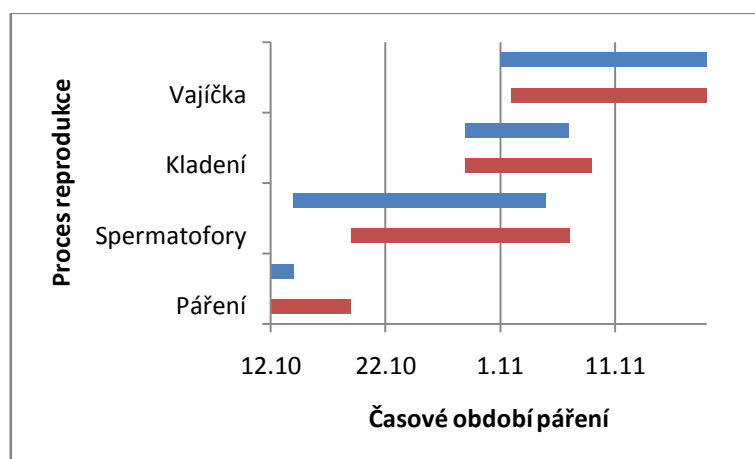
Příloha 14 – Elektronový mikroskop. (Foto: autor).



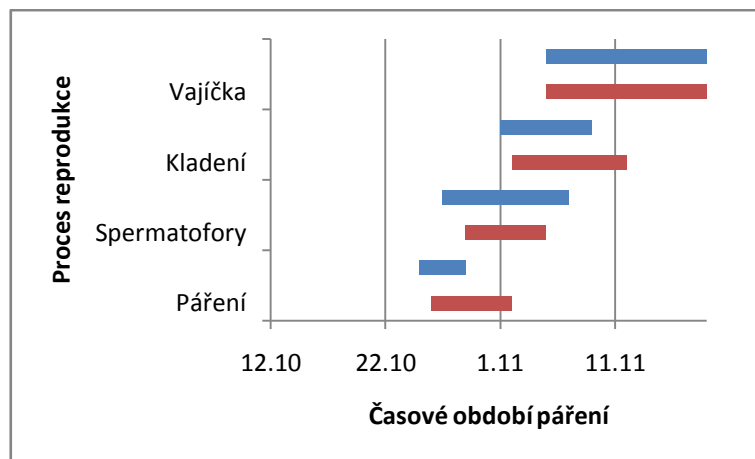
Příloha 15 – Regresní přímka závislosti počtu spermatoforů na délce raka.



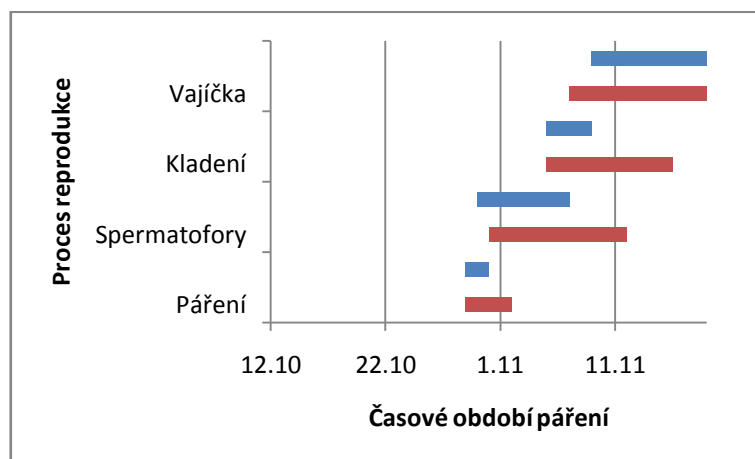
Příloha 16 – Regresní přímka závislosti počtu spermatoforů na hmotnosti raka.



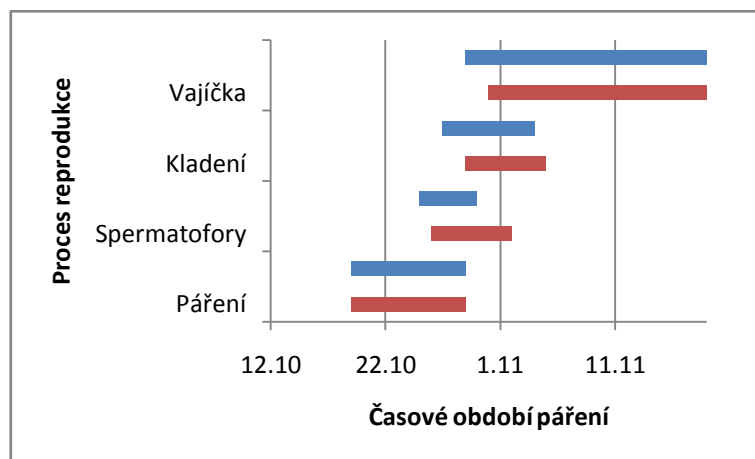
Příloha 17 – Grafické znázornění reprodukce první skupiny v roce 2012 a 2013.



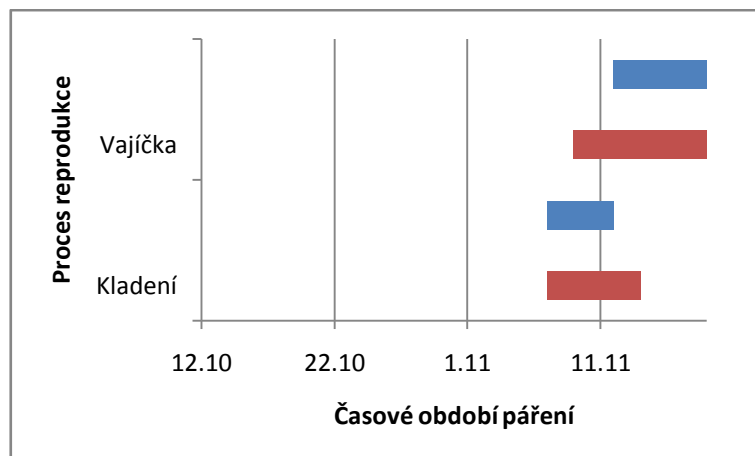
Příloha 18 – Grafické znázornění reprodukce druhé skupiny v roce 2012 a 2013.



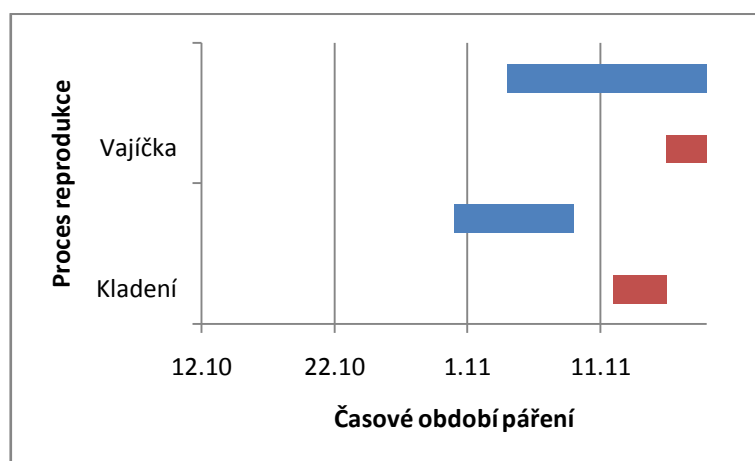
Příloha 19 – Grafické znázornění reprodukce třetí skupiny v roce 2012 a 2013.



Příloha 20 – Grafické znázornění reprodukce čtvrté skupiny v roce 2012 a 2013.



Příloha 21 – Grafické znázornění reprodukce páté skupiny v roce 2012 a 2013.



Příloha 22 – Grafické znázornění reprodukce šesté skupiny v roce 2012 a 2013.



Příloha 23 – Průběh aktu páření v experimentu hybridizace. (Foto: autor).



Příloha 24 – Samice raka říčního s vajíčky na pleopodech. (Foto: autor).



Příloha 25 – Samice raka bahenního spářená se samcem raka říčního. (Foto: autor).





Příloha 26 – Samice raka říčního spářená se samcem raka bahenního. (Foto: autor).



Příloha 27 – Vajíčka nakladená samicí raka bahenního bez přítomnosti samců. (Foto: autor).

## 11. Abstrakt

---

V přírodě se raci reprezentují jako predátoři nebo i část potravní základny některých ryb. Ve volných vodách působí také jako detritivoři, a jsou tak důležitým prvkem v koloběhu živin a energie ve vodním ekosystému. Rakům se však nevyhnuly negativní dopady antropogenní činnosti jako znečištění vod a devastace habitatů. Z těchto důvodů je zapotřebí reprodukce raků v líhních a farmách. Hlavním cílem mé práce bylo studium reprodukční biologie u raků se zaměřením na proces páření, interval mezi pářením a kladením vajíček, oplodněním a morfologickou strukturu samčích a samičích gamet. Mezi vedlejší cíle bylo zařazeno využití opakované elektrostimulace u raků a možnost existence hybridů raka říčního (*Astacus astacus*) a raka bahenního (*Astacus leptodactylus*). Pozorování období reprodukce proběhlo na zástupcích raka říčního a raka bahenního, pomocí přirozeného páření v nádržích. Struktura gamet byla pozorována na vzorcích odebraných od raka říčního (*Astacu astacus*), raka bahenního (*Astacus leptodactylus*), raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*), raka červeného (*Procambarus clarkii*) a raka pruhovaného (*Orconectes limosus*). Experimenty se uskutečnily během podzimního období v roce 2012 a 2013. Výsledky pozorování reprodukce raků nám více přiblížily období a intervaly všech fází procesu páření raků. U samic raka říčního i raka bahenního bylo zjištěno naklazení vajíček bez přítomnosti samců. Pomocí ultrastruktury samčích a samičích gamet byly popsány jejich jednotlivé složky. Opakovaná elektrostimulace se ukázala u čeledi Astacidae jako vhodný prostředek pro sbírání většího množství spermatického materiálu. Experiment hybridizace dokázal, že může docházet ke spáření obou druhů raků v lokalitách, kde se vyskytují současně. Tyto experimenty pomohly v dalším poznání reprodukční biologie raků.

Klíčová slova: rak, páření, kladení vajíček, ultrastruktura, spermie, vajíčka, hybridizace, elektrostimulace

## 12. Abstract

---

In the nature, crayfish are represented like predators or a part of food base of some fish. Also in free waters they acts as detrivors and are an important element in the nutrient and energy circle in aquatic ecosystem. The crayfish weren't able to avoid negative impacts of anthropogenic activities such as water pollution and devastation of habitats. For these reasons reproduction of the crayfish is necessary in hatcheries and farms. The main aim of my work was to study the reproductive biology of the crayfish focused on the process of mating, the interval between mating and laying eggs, fertilization and morphological structure of the male and female gametes. Among the secondary objectives there was included using of repeated electrostimulation of the crayfish and the possibility of hybrids of the noble crayfish (*Astacus astacus*) and the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). The observation of the period of reproduction was realized on representativies of the noble crayfish and the narrow-clawed crayfish throughout natural mating in the tanks. The structure of gametes was observed on the samples taken from thenoble crayfish (*Astacus astacus*), the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*), the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and spinycheek crayfish (*Orconectes limosus*). The experiments were carried out during the autumn season in 2012 and 2013. The results of observations of the reproduction of crayfish made us clear as for the period and intervals for all phases of the process of mating crayfish. For females the noble crayfish and the narrow-clawed crayfish was found oviposition without the presence of males. Their individual components have been described by using ultrastructure of males and female gametes. Repeated electrostimulation showed at the family Astacidae as a suitable tool for collecting large mass of sperm material. Hybridization experiment proved that it can occur to mate the two species of crayfish in areas where they occur simultaneously. These experiments helped to further knowledge of reproductive biology of crayfish.

Key words: crayfish, mating, egg laying, ultrastructure, sperm, egg, hybridization, elektrostimulation