

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv přirozené potravy na vývoj pohlavních buněk
parmy obecné (*Barbus barbus*)**

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Irena Šetlíková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Jitka Turová

Autor diplomové práce: Bc. Ivona Zikmundová

České Budějovice, duben 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pouze za použití pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě v úpravě vzniklé vypuštěním význačných částí archivovaných Zemědělskou fakultou – 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 práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 5. 5. 2017

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Ireně Šetlíkové, Ph.D., za příkladné vedení mé diplomové práce. Mgr. Jitce Tumové za cenné rady a čas, který mi mile věnovala. Velké díky patří Mgr. Ondřeji Mottlovi za pomoc při zpracování výsledků v programu R a za jeho trpělivost při zodpovídání mých otázek. Děkuji také svým přátelům, kteří mi pomáhali a podporovali mě v průběhu psaní této práce.

Abstrakt

Novodobé tendence v chovu parmy obecné (*Barbus barbus*) se zaměřují na její umělý výtěr a následné odkrmení. Vyšší podíl přirozené potravy při chovu parmy obecné by mohl pozitivně ovlivnit její pohlavní zralost. V tomto pokusu byly vyhodnoceny vzorky gonád z pokusu Polícar a kol., (rukopis v přípravě). Potrava 1 byla složena pouze z umělého krmiva Caprico (100 %), potravu 2 tvořilo totéž krmivo Caprico (65 %) a zbytek byl *Daphnia* sp. (35 %). V potravě 3 převažovala *Daphnia* sp. (70 %) nad umělým krmivem Caprico. Vliv přídavku přirozené potravy (*Daphnia* sp.) na gonadosomatický index (GSI) ani na plochu pohlavních buněk jikernaček a mlíčáků parmy obecné nebyl statisticky průkazný. Nicméně mlíčáci krmení potravou obsahující přirozenou složku měli $2,29 \pm 1,62$ % a $3,50 \pm 2,72$ % oproti mlíčákům krměným výlučně umělou potravou ($1,46 \pm 1,52$ %). Přídavek přirozené potravy průkazně urychlil zrání pohlavních buněk, a to jak u jikernaček, tak i u mlíčáků. Většina pohlavních buněk, jak jikernaček, tak mlíčáků krměných potravou s převahou přirozené složky byla ve III. či IV. stádiu vývoje.

Klíčová slova: parma obecná, *Barbus barbus*, GSI, vývoj pohlavních buněk, potrava

Abstract

The modern tendencies in breeding of common barbel are focused on its artificial swab and subsequent fattening. Higher proportions of natural food in general barbel breeding could positively affect its sexual maturity. In this experiment, gonadal samples were evaluated from the experiment by Policar et al., (manuscript in preparation). Diet 1 was composed only of Caprico artificial feed (100%), diet 2 was the same feed Caprico (65%) and the rest was *Daphnia* sp. (35%). In Diet 3, *Daphnia* sp. (70%) prevailed over the Caprico manure. There was no statistical influence of the addition of natural food (*Daphnia* sp.) neither on the gonadosomatic index (GSI) nor on the scope of fish genes of male and female common barbel. However, male fish (milt) fed with the natural ingredient had 2.29 ± 1.62 % and 3.50 ± 2.72 % versus those fed exclusively with artificial food (1.46 ± 1.52 %). The addition of natural food has significantly accelerated the maturation of sex cells, both in the female and in the male fish. Most of the sex cells of both female and male fish fed with the predominance of the natural component, were in III. or IV. stage of development.

Key words: - *Barbus barbus*, GSI, development of sex cells, feeding

Obsah

1.	Úvod a cíl práce	8
2.	Literární přehled.....	9
2.1	Popis druhu.....	9
2.2	Biotop a potrava	9
2.3	Rozmnožování.....	10
2.4	Současný stav a ohrožení parmy v ČR.....	11
2.5	Význam parmy pro rybolov a její ochrana.....	12
2.6	Využití krmiv v produkci násadového materiálu	12
3.	Materiál a metodika.....	14
3.1	Uspořádání a průběh pokusu	14
3.2	Analýza nutričního složení potravy.....	15
3.3	Histologické vyšetření gonád	17
3.4	Zpracování a statistické vyhodnocení dat	22
4.	Výsledky	23
4.1	Vliv potravy na gonadosomatický index.....	23
4.2	Vliv potravy na stádium vývoje pohlavních buněk.....	24
4.3	Vliv potravy na velikost pohlavních buněk.....	26
5.	Diskuze.....	29
6.	Závěr	33
7.	Použité zdroje.....	34
7.1	Tištěné a elektronické zdroje.....	34
8.	Přílohy	40

1. Úvod a cíl práce

Antropogenní vlivy se negativně projevují na početnosti a diverzitě rybích společenstev (Lusk a kol., 2011). Tento jev je nejvíce patrný u ryb, které mají specifické nároky na prostředí a jejichž přizpůsobivost na změny je obvykle nízká. Mezi druhy s klesající tendencí výskytu, vlivem změn způsobených člověkem patří i parma obecná (*Barbus barbus*) (Dvořák, 1982). Ve vodních tocích parma požíváním rostlinných zbytků, příjmem řas a rozsivek z kamenů zabraňuje eutrofizaci vody (Dyk, 1977). Vzhledem ke svému bentickému způsobu života, je parma obecná jedním z nejvýznamnějších bioindikátorů některých polutantů, především rtuti na lokalitách s tekoucí vodou a s nízkým zastoupením dravých ryb (Peňáz a kol., 2002a). Navíc je parma pro svoji bojovnost a sílu při zdolávání vyhledávanou rybou pro sportovní rybáře (Hanel a Lusk, 2005). Z výše uvedených důvodů patří parma bezesporu mezi žádané rybí druhy. Její produkce, resp. produkce plůdku parmy je však v současné době stále nedostatečná. K podpoře přirozených společenstev jsou k výtěru používány ryby, které byly odloveny na trdlištích. Jde tedy o negativní zásah do přirozené reprodukce parmy. Navíc následný výtěr je s ohledem na asynchronní výtěr jikernaček a neurčitosti stáří ryb nejistý, a s tím je nejistá i následná produkce plůdku (Krupka, 1987; Technická zpráva pilotního projektu, 2012). V České republice se parma neprodukuje ke konzumním účelům, ale pouze pro zarybnění volných vod. Odchovem plůdku se u nás zabývá jen několik málo rybářství (Tatarčíková, 2006).

Cílem této práce bylo zjistit, zda přirozená potrava (či její podíl) ovlivňuje ve srovnání s umělým krmivem růst a vývoj gonád při odchovu palem. Pokud by se potvrdilo, že určitý typ potravy urychluje zrání pohlavních buněk, tak by mohl být násadový materiál v umělých líhních produkován za kratší dobu. Pro svou práci jsem měla k dispozici již hotové trvalé histologické preparáty gonád (celkem 104 vzorků), které jsem následně vyhodnotila dle dále uvedené metodiky.

2. Literární přehled

2.1 Popis druhu

Parma obecná (*Barbus barbus*, Linnaeus, 1758) patří do čeledi Cyprinidae. Je to dlouhověká ryba dorůstající do délky až 120 cm, přičemž průměrná hmotnost dospělého je 5 kg (Baruš a Oliva, 1995). Parma je přizpůsobena životu v proudu, její tělo je válcovité se zploštělou hlavou s poměrně malými očima (se zlatou duhovkou). Parma je charakteristická svými čtyřmi vousky na horním rtu spodních úst, přičemž zadní pár vousků je delší než přední (Bănărescu a Bogutskaya, 2003; Dubský a kol., 2003). Tělo je pokryto zapuštěnými šupinkami, pevně usazenými v kůži (Lusk a kol., 1983). Hřbetní ploutev je vysoká, její výška může dosahovat až 20 % celkové délky těla. Ocasní ploutev bývá asymetrická, horní lalok je špičatější a delší než dolní (Baruš a Oliva, 1995; Hanel a Lusk, 2005). Párové ploutve jsou načervenalé, ostatní ploutve jsou šedo zelené (Lusk a kol., 1983). Hřbet je olivově zelený, boky jsou nazelenalé nebo nazlátlé, břicho běložluté. Ročci parmy mohou být mramorovaně skvrnití. V některých případech pigmentace přetrvává i u dospělých ryb (Hanel a Lusk, 2005). U parmy obecné existují místní odchylky ve zbarvení. Barvu ovlivňuje i dno řek, parma je tmavší na kamenitěm podkladu a světlejší na písčíně (Baruš a Oliva, 1995; Bănărescu a Bogutskaya, 2003).

2.2 Biotop a potrava

Parma obecná obývá proudící a dobře okysličené úseky řek střední až velké velikosti. Vyhýbá se úsekům s bahnitým dnem a naopak dává přednost místům s kamenitým až písčitém dnem. Upřednostňuje dno šterkovité. V některých lokalitách, za určitých podmínek se projevuje jako dobře přizpůsobivý druh, může se tak vyskytovat i v některých údolních nádržích s čistou vodou (Baruš a Oliva, 1995; Hanel a Lusk, 2005). Pro parmu je typický bentický způsob života. Aktivita je denní i noční. Ve dne obývá silné proudy a v noci vyhledává potravu (Müller, 1987; Baruš a Oliva, 1995). Parma obecná je výrazný bentofág. Hlavní složku potravy tvoří larvy chrostíků, pošvatek a jepic, dále měkkýši a další vodní bezobratlí. Nedílnou součástí její potravy jsou však i vláknité řasy, rozsivky a detrit. Nepohrdne ani jikrami jiných ryb či menšími rybky. Díky silnému rypci obrací i těžší kameny, proto dosáhne na různé složky potravy, které jsou ostatními druhy ryb opomíjeny (Lusk a kol., 1983; Müller, 1987; Baruš a Oliva, 1995; Hanel, 1995).

Parma se nevyskytuje pouze v parmovém pásmu, které je pro ni typické. Je známa svými migracemi do ostatních rybích pásem (Lusk a kol., 2011). Při nástupu zimních měsíců se parmy hromadně stahují do pomalu tekoucích toků. Snižuje svoji aktivitu a v hloubkách vyhledává členitý terén s úkryty mezi kameny, listím a pod převislými stromy u břehu (Lusk a kol., 1983; Kottelat a Freyhof, 2007). Další migraci podstupuje při reprodukci, kdy vyhledává vhodný habitat pro tření v přejezdných úsecích (Lusk a kol., 2011).

2.3 Rozmnožování

Parma pohlavně dospívá mezi 4. - 6. rokem života, v méně úživných tocích i později (Hochman, 1963; Lusk a kol., 1983). Samci se poprvé třou asi o 1 - 2 roky dříve než samice. Tření probíhá od května do července. Když se teploty vody udrží alespoň na 14 °C, může tření pokračovat až do září. Při tření se mlíčáci jikernačkám dvoří. Samice se nevytírá najednou, ale v intervalech, které trvají 10 až 15 dnů (Kottelat a Freyhof, 2007). Dozrávání jiker je nerovnoměrné, před výtěrem se nachází v gonádách čtyři až pět velikostí jiker. Při vytření uvolní jikernačka parmy pouze polovinu jiker. Celkový objem jiker je závislý na velikosti jikernačky (Krupka, 1987). Jikernačka mívá až 60 tisíc mírně lepkavých jiker na 1 kg hmotnosti. Jikry jsou při bouřlivém tření rozmetány mezi kameny v mělkém úseku trdliště (Hanel, 1995, Dubský a kol., 2003). Mlíčáci parmy se v době tření vyznačují třecí vyrážkou na temeni a hřbetu těla, jejich ploutve bývají intenzivně zbarveny. Samci při páření vypouští mlíčí kontinuálně, na rozdíl od jikernaček (Vladykov, 1931; Dyk a kol., 1949, Krupka, 1987, Kottelat a Freyhof, 2007).

U parem jsou před a během období tření gonády a okolní svalovina jedovaté. Gonády totiž obsahují termostabilní lipoprotein cypridin, po jehož požití nastává tzv. "parmová cholera". Ta se projevuje křečemi, průjmem, zvracením, horečkou a úpornou žízní. Je doporučeno vnitřnosti nekonzumovat a svalovinu potřít roztokem kuchyňské soli, čímž se ichthyotoxin zničí (Müller, 1987; Sysová, 2001; Hanel a Lusk, 2005).

2.4 Současný stav a ohrožení parmy v ČR

Parma je typickou rybou parmového pásma většiny toků v ČR. Po roce 1950 byl výskyt tohoto druhu výrazně snížen. K poklesu úlovků vedlo mimo jiné i zvýšení lovné míry z 35 cm na 40 cm (Lusk a kol., 1983). Dle statistiky úlovků bylo od roku 2005 do roku 2015, v mimopstruhových a pstruhových revírech uloveno o 80 % méně parem než v letech předchozích (1994 - 2004) (Český rybářský svaz, 2017a).

Občasný výkyv ve stavech parmy může mít několik důvodů. Selhání přirozeného výtěru, kdy se na trdlištích sejde příliš nerovnoměrné zastoupení pohlaví. Studeným létem, kdy teploty pro vykulení plůdku nejsou příznivé a také některými parazitárními onemocněními (Dyk, 1977). Činnost člověka také ovlivňuje vykulení plůdku, neboť vlivem organického znečištění vody nemají jikry příznivé kyslíkové podmínky, a tak hynou (Hochmann, 1963). Výstavba velkých vodních děl ve 20. století výrazně přispěla ke snížení stavu populace parmy. Tak došlo k omezení migrace ryb, devastaci přirozených stanovišť a snížení dostupnosti přirozené potravy (Dyk, 1977; Lusk, 1996). V posledních několika letech je největší problém expozice ryb estrogenními látkami a s nimi spojené změny na vnitřních orgánech (Čechová, 2012). Dnes se parma z ekologického stresu zotavuje a v rybí obsádce je patrný její vzestup (Peňáz a kol., 2002b).

V České republice se produkci násadového materiálu parmy věnuje jen několik málo rybářství. V rámci Moravského rybářského svazu (MRS) je největším producentem ročka parmy Rybí líheň, s.r.o. v areálu v Poušově. Generační ryby získává přímo na trdlištích, v různých lokalitách. Z důvodu malé produkce cenných jiker probíhá počáteční odchov parmy v recirkulačním zařízení, do doby než jsou jedinci odolnější (cca stáří 2 týdny). Přežití po vysazení do přirozeného prostředí se tak zvýší na 70 %. Ročně produkují 60 tisíc kusů ročka (Tatarčíková, 2006). Rybářství Litomyšl taktéž produkuje násadový materiál parmy i dalších druhů ryb, z nichž 20 % je určeno na export do dalších států EU (Rybářství Litomyšl, 2017). Produkci parmy by se věnovali rádi i další líhně, bohužel problém spočívající v nedostatku generačních ryb stále přetrvává (Křivanec, 2017)

2.5 Význam parmy pro rybolov a její ochrana

S nárůstem členů Českého rybářského svazu (ČRS)¹ roste i tlak na vodní toky, a s tím i na rybí obsádku. I přes to, že parma obecná nemá vzhledem k většímu počtu svalových kůstek příliš kvalitní maso, patří mezi druh vyhledávaný sportovními rybáři (Český rybářský svaz, 2017b; Baruš a Oliva, 1995). Při lovu je velmi bojovná, klade velký odpor a využívá proudy ve svůj prospěch. Parma není snadným úlovkem, a tak je sportovními rybáři velmi ceněna (Lusk a kol., 1983; Hanel a Lusk, 2005). Další význam pro rybolov má parma jako čistič vodního prostředí. Omezuje nástup eutrofizace vody požitím zbytků rostlinného i živočišného původu. Odebírá z povrchu kamenů rozsivky a řasy, které bují v letních měsících vlivem vysokých teplot a nízkého obsahu kyslíku ve vodě. To jak parma udržuje prostředí vodních toků, přispívá k lepším podmínkám pro náročnější rybí druhy, především pstruhy, lipany a hlavatky (Dyk, 1977).

Parma je hájena od 16. března do 15. června dle § 13 vyhlášky č. 197/2004 Sb. (Zákony pro lidi, 2017a). V revírech Jihočeského územního svazu ČRS České Budějovice je parma hájena celoročně (ČRS ČB, 2017). Od 1. ledna 2016 platí celoroční hájení parmy i na vybraných revírech řeky Jihlavy (platné do 31. 12. 2017, MRS 2017). V rámci legislativy EU Směrnice Rady č. 92/43/EHS je rod *Barbus* řazen do přílohy V. - druhy živočichů a rostlin, jejichž odebírání z volné přírody a využívání může být předmětem určitých opatření na jejich obhospodařování (Nature, 2017). V legislativě ČR jej najdeme ve vyhlášce č. 166/2005 Sb., v příloze C (Zákony pro lidi, 2017b). V Červeném seznamu ČR je parma řazena mezi téměř ohrožené druhy (ISOP, 2017). Na parmu, jakožto zvíře chované pro produkci, se vztahují i zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a veterinární zákon č. 166/1999 Sb. Nové předpisy o usmrcování zvířat pro vědecké účely jsou zodpovězeny v novele zákona na ochranu zvířat proti týrání, č. 359/2012 Sb. (Müllerová a Stejskal, 2013).

2.6 Využití krmiv v produkci násadového materiálu

Se zvyšujícím se zájmem veřejnosti o rybářský sport roste i snaha vodní toky zásobit kvalitním násadovým materiálem. Pro tyto účely je nutno kvalitně odkrmit plůdek i remontní ryby, u nichž by mohla volba vhodného krmiva urychlit jejich

¹ V roce 2016 byl celkový počet členů ČRS 244 155 rybářů

dospívání. S použitím kvalitního a dobře zvoleného krmiva, při zajištění optimálních podmínek pro daný druh, je možno dosáhnout lepší produkce a ekonomiky při produkci násadových ryb (Mareš a kol, 2015). Potřeba živin je závislá na řadě abiotických a biotických faktorů. Nutriční požadavky ryb se odlišují u studenomilných karnivorních (lososovitých) a teplomilných omnivorních (kaprovitých) ryb. Dále například, starší ryby mají odlišné potravní nároky než juvenilní jedinci (Jirásek a kol., 2005).

Vliv krmiv se testuje již několik desítek let a to především v průběhu reprodukce ryb v kontrolovaných podmínkách. Zde je uvedeno několik příkladů využití krmiv. U některých ryb bylo použito polovlhkých směsí při počátečním odchovu plůdku např. u okouna obecného (*Perca fluviatilis*) a sumce velkého (*Silurus glanis*) (Mareš a Jirásek, 1999; Mareš a Hillermann, 2002). Další pokusy byly prováděny u lososovitých ryb, pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a sívena amerického (*Salvelinus fontinalis*). Test se týkal vlivu krmiva na produkci ryb (Ošanec, 2014).

U čeledi kaprovitých byl vliv krmiva testován u několika druhů, například při odchovu juvenilů ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus*) byla využívána, jak suchá krmiva, tak i přirozená potrava (Spurný a kol., 2004). U lína obecného (*Tinca tinca*) byl taktéž zkoumán vliv krmiva na juvenilní jedince, ale bez použití přirozené potravy (Mareš a kol., 2006). Vliv krmiv se může uplatnit i při zlepšení kvality masa, což bylo studováno u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (Vobr, 2012).

Podmínky chovu, které vedly k úspěšné pohlavní dospělosti parmy s následnou produkcí potomstva, zpracovali Philippart a kol. (1989), Philippart (1982, 1986 a 1987), Poncin a kol. (1985, 1987) a Poncin (1989). Základem úspěchu je přirozený nebo ustálený světelný režim (světlo: tma 10:14 hodin) a konstantní teplota vody 20 - 21 °C. V České republice se odchovem parem v kontrolovaných podmínkách zabývalo několik autorů. Policar a kol. (2007a) uvádějí pozitivní vliv přídavku přirozené potravy (monokultura perlooček) jak na vývoj oocytů i spermií, tak na snížení tučnosti gonád. Podobně, pozitivní vliv na morfologii a rychlost spermií byl prokázán u mlíčáků parmy krmených granulovaným krmivem s přídavkem larev pakomárů (Alavi a kol., 2008).

3. Materiál a metodika

3.1 Uspořádání a průběh pokusu

Pokus probíhal ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech (Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích). Pro pokus byly použity juvenilní parmy obecné ve věku 11 měsíců s průměrnou hmotností (W) $5,35 \pm 0,1$ g a délkou těla (TL) $8,4 \pm 0,5$ cm. Parmy pocházely z umělého výtěru, plůdek byl krměn buďto *Artemia* sp. nebo umělým krmivem Asta (Policar a kol., 2007b).

Do všech akvárií o objemu 1 m^3 bylo nasazeno 75 ryb, tj. počáteční obsádka odpovídala zhruba 4 kg m^{-3} . Ryby byly rozděleny do třech skupin, dle složení předkládaného krmiva. Skupina 1 byla krmena výlučně umělým krmivem Caprico – Prime 6, skupina 2 byla krmena stejným krmivem, ale to představovalo jen 65 % hmotnosti předkládaného krmiva a zbytek (tj. 35 %) tvořily *Daphnia* sp. Skupině 3 byly předkládány převážně *Daphnia* sp. (70 %) a umělé krmivo tvořilo jen 30 % hmotnosti podávaného krmiva. Každá z těchto tří variant měla dvě opakování (tj. akvárium A, A_r, B, B_r, C, C_r). *Daphnia* sp. (Ocean Nutrition Europe) byly skladovány ve zmraženém stavu, při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Před kmením byly ponořeny na 5 minut do vodní lázně o teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C}$. *Daphnia* sp. byly předkládány každé ráno v 7:00 h pomocí difuzoru, tak aby měly všechny ryby možnost získat toto krmivo. Caprico Prime - 6 (firmy Coppens) bylo podáváno ve formě pelet o velikosti 1,5 mm. Jedná se o komerční krmivo pro kaprovité ryby, které bylo podáváno během světelné části dne pásovým krmítkem. Pokus byl rozdělen na 5 období, přičemž každé trvalo 35 dnů, tj. celkově pokus trval 175 dní. V prvních třech obdobích odpovídalo množství konzumovaného komerčního krmiva 2,5% hmotnosti ryb, ve 4. období 2% a v 5. období 1,5% hmotnosti ryb. Ve variantách pokusu, kde byly ryby krmeny *Daphnia* sp. (potrava: 2 a 3) odpovídala celková hmotnost předkládané potravy 120% (u potravy 2) a 160% (u potravy 3) hmotnosti výlučně umělého krmiva (potrava 1) (viz také tab.1). Toto navýšení hmotnosti předkládané potravy vyrovnává nižší množství sušiny přirozené potravy (*Daphnia* sp.) oproti umělému krmivu (Policar a kol., rukopis v přípravě).

Po celou dobu pokusu byl světelný režim 10:14 hodin (světlo: tma). Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota vody byla měřena dvakrát denně (7:00

a 15:00 h) oxymetrem WTW Multiline P4. Jednou denně bylo pomocí WTW pH metru 330i měřeno pH vody. Průměrná teplota vody se pohybovala okolo $21 \pm 0,9$ °C, koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě byla $6,5 \pm 0,1$ mg.l⁻¹ a pH vody bylo $6,8 \pm 0,2$. V týdenním intervalu byly měřeny (kontrolovány) hodnoty koncentrace amoniakálního (NH₄-N), dusitanového (NO₂-N) a dusičnanového dusíku (NO₃-N), a to podle metod Horáková a kol. (1989). Koncentrace NO₃-N kolorimetricky salicylanem sodným; NO₂-N kolorimetricky kyselinou sulfanylovou a N-(1-naftyl)-etylen-diamin dihydrochloridem; NH₄-N Nesslerovou metodou po destilaci. Tyto chemické parametry vody byly udržovány v rozmezí hodnot doporučených pro kaprovité ryby (Policar a kol., rukopis v přípravě).

Na konci pokusu bylo zváženo deset mlíčáků a deset jikernaček z každého akvária. Po usmrcení (dle zákona č. 359/2012 Sb., Veřejná správa, 2017), byly vyjmuty a zváženy i jejich gonády (váhy Mettler - model AE 200, přesnost na 0,01 g) (Policar a kol., rukopis v přípravě). Na základě těchto údajů byl vypočítán gonadosomatický index ($GSI = \frac{\text{hmotnost gonád}}{\text{hmotnost ryby}} \times 100$) (Pokorný a kol., 2003).

3.2 Analýza nutričního složení potravy

Složení jednotlivých typů potravy bylo provedeno ve Výzkumném ústavu potravinářském v Praze, v oddělení jakostních znaků a na Katedře aplikované chemie, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Aminokyseliny a mastné kyseliny byly analyzovány kapalinovou chromatografií (HPLC, Spectra systém P2000) a plynovou chromatografií (GC Varian 3300) v daném pořadí. V potravě 1, 2 a 3 byly určeny i další důležité parametry (tab. 1) (Policar a kol., rukopis v přípravě).

Tab. 1 Nutriční hodnoty u jednotlivé potraviny (Polícar a kol., rukopis v přípravě)*

	Potrava 1	Potrava 2	Potrava 3		Potrava 1	Potrava 2	Potrava 3
Bílkoviny (% v sušině)	33,0	36,0	39,0	Tuky (% v sušině)	6,0	6,20	6,30
Aminokyseliny (% v sušině)				Mastné kyseliny (Mcal.kg ⁻¹ v sušině)			
<i>LYS</i>	1,84	2,10	2,34	<i>C18:0</i>	7,62	6,95	6,00
<i>ARG</i>	1,55	1,71	1,82	<i>C20:0</i>	0,95	0,95	0,95
<i>HIS</i>	0,53	0,65	0,72	<i>C20:1</i>	4,30	3,70	2,75
<i>ILE</i>	1,22	1,42	1,55	<i>C21:0</i>	0,65	0,60	0,50
<i>LEU</i>	2,14	2,42	2,68	<i>C16:1n7</i>	18,35	14,95	13,40
<i>VAL</i>	1,47	1,78	1,86	<i>C18:1n9</i>	20,55	21,30	21,90
<i>MET</i>	0,57	0,88	0,96	<i>C18:2n6</i>	5,30	5,15	3,80
<i>CYS</i>	0,35	0,52	0,63	<i>C18:3n3</i>	3,80	4,05	4,20
<i>PHE</i>	1,20	1,44	1,58	<i>C18:3n6</i>	0,40	0,20	0,20
<i>TYR</i>	0,86	1,04	1,12	<i>C18:4n1</i>	0,30	0,20	0,10
<i>THR</i>	1,27	1,44	1,56	<i>C18:4n3</i>	2,90	3,40	4,25
<i>ASP</i>	2,59	2,88	3,05	<i>C20:1n9</i>	7,90	9,20	9,60
<i>GLU</i>	3,71	4,08	4,23	<i>C20:2n6</i>	3,15	1,55	1,00
<i>SER</i>	1,25	1,45	1,68	<i>C20:3n6</i>	2,50	1,40	0,80
<i>GLY</i>	1,84	2,06	2,25	<i>C20:4n3</i>	1,95	2,80	3,65
<i>ALA</i>	1,89	1,99	2,16	<i>C20:4n6</i>	2,30	3,25	4,00
<i>PRO</i>	1,23	1,49	1,76	<i>C20:5n3</i>	4,40	5,45	6,35
Čistá energie (Mcal.kg ⁻¹ v sušině)	3,70	3,80	3,90	<i>C22: 5n3</i>	7,45	8,75	9,45
Met. energie (Mcal.kg ⁻¹ v sušině)	3,40	3,50	3,60	<i>C22:6n3</i>	4,65	5,75	6,75
Vláknina (% v sušině)	4,20	4,10	4,10	∑ SFA	9,22	8,50	7,45
Popel (% v sušině)	8,30	8,40	8,50	∑ MUFA	51,10	49,15	47,65
Sušina (%)	95,00	78,00	60,00	∑ PUFA	39,10	41,90	44,55
Hm. podíl potraviny ve srov. s potravou 1	1,00	1,20	1,60	n-3/n-6	1,84	2,61	3,54

*zkratky uvedené v tabulce jsou zařazeny v příloze

3.3 Histologické vyšetření gonád

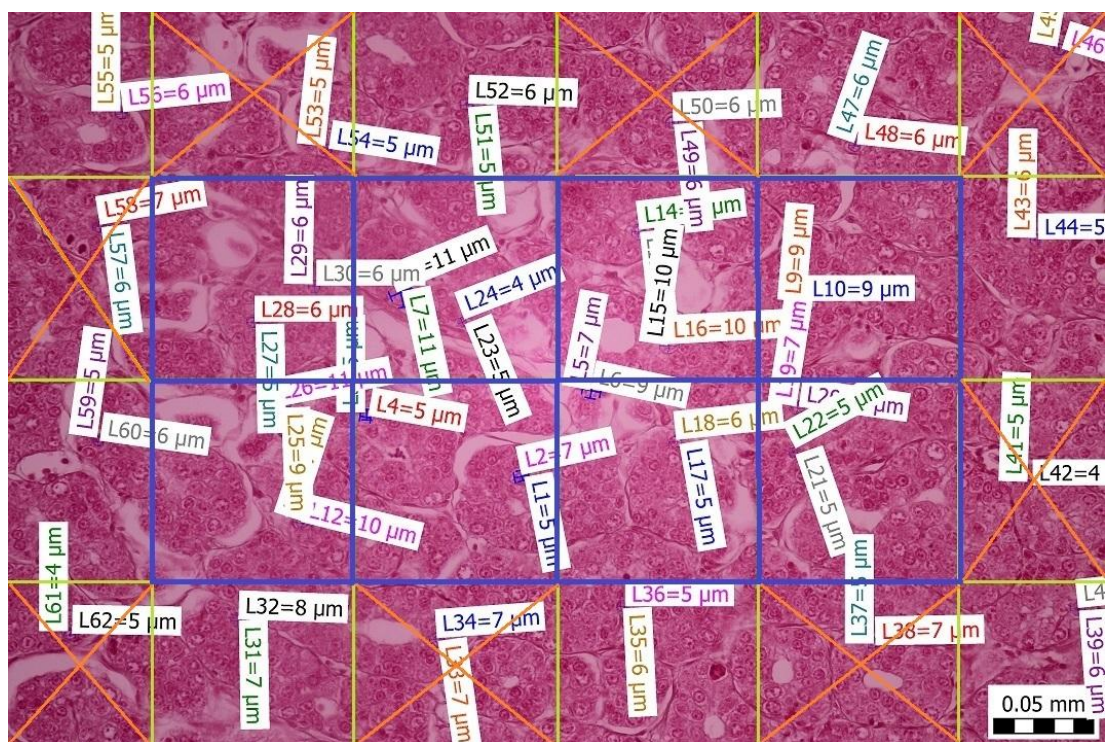
Celé gonády byly jednotlivě uloženy a zafixovány v Bouinově roztoku po dobu jednoho měsíce. Poté byly z centrálních částí gonád uříznuty menší kusy. Nařezané kusy gonád byly dehydratovány a následně obaleny do parafinových bločků (Leica Histowax; Histolab Products AB, Sweden). Po deparafinaci byly jednotlivé bločky obarveny Mayerovým roztokem hematoxylinu v kombinaci s eosinem. Z bločků byly nařezány 5 nebo 7 μm řezy (Leitz mictotome, model 1208), které byly jednotlivě přeneseny na podložní sklíčka. Sklíčka s řezy byla následně překryta krycími sklíčky. Z některých vzorků se nepodařilo zhotovit preparáty. Proto byly nahrazeny novými preparáty parem z pokusu v různém poměru pohlaví (tab. 1). U nahrazených vzorků nebyly k dispozici biometrické údaje. Celkový počet vzorků s biometrickými údaji byl 60 ks. Pod světelným mikroskopem Olympus CX31 bylo, při různých zvětšeních (4x10, 10x10 a 40x10) určeno pohlaví ryb. Pro další měření nebyly dále použity preparáty, kde byl identifikován intersex, tuková tkáň bez pohlavních buněk či, malé vzorky gonád bez dostatečného počtu pohlavních buněk (tab. 2).

Tab. 2 Počet vzorků v jednotlivých variantách pokusu

potrava/ akvárium	jikernačky (ks)	mlíčáci (ks)
1A	5	10
1A_r	6	16
2B	6	12
2B_r	1	11
3C	9	6
3C_r	5	11

V každém preparátu byla pod světelným mikroskopem vybrána vždy reprezentativní část gonády, ta byla vyfotografována pomocí připevněného digitálního fotoaparátu Canon EOS Rebel T3 a zpracována (změřena) v programu QuickPHOTO MICRO 3.1. Do snímku tkáně byla pro lepší orientaci vložena mřížka s 24 čtverci (obr. 1). Měřena byla vždy délka a šířka pohlavních buněk s přesností na

1 μm . Ve všech osmi vnitřních čtvcích (viz čtverce orámované modře v obr. 1) byla změřena vždy nejmenší a největší pohlavní buňka v dané oblasti ($n = 16$). Po obvodu snímku (část okolo modře orámovaných čtverců viz obr. 1) byly v osmi čtvcích (proškrtnané oranžově viz obr. 1) změřeny nejmenší buňky. V dalších osmi obvodových čtvcích (neproškrtnané čtverce s dvěma žlutozelenými stranami) byly naopak změřeny největší buňky. Celkově bylo v obvodové části snímku změřeno dalších 16 buněk. Tímto měřením bylo zajištěno pokrytí celého velikostního spektra pohlavních buněk v jednotlivých čtvcích (Tumová, ústní sdělení). Po zjištění lineární závislosti byla z délky a šířky změřených pohlavních buněk spočítána jejich plocha. Buňky měly spíše oválný tvar, a proto byl zvolen výpočet pro plochu elipsy ($S = a \cdot b \cdot \pi$).



Obr. 1 Příklad řezu gonádou mlčíčka a jeho zpracování v QuickPHOTO MICRO 3.1

Stádia vývoje byla vyhodnocena jak vizuálně, tak na základě námi sestavené tabulky dle velikosti pohlavních buněk. Tabulka pro určení stádií vývoje gonád dle velikosti pohlavních buněk byla sestavena pomocí Genten a kol. (2009) a Mgr. Jitky Tumové z VÚRH Vodňany. Každé vývojové stádium pohlavní buňky je charakterizováno určitou velikostí pohlavních buněk, a proto jsme se zaměřili na měření jejich délky a šířky. Výsledná velikost pohlavních buněk pak byla stanovena z průměrných délek a šířek u jednotlivých vzorků (98 vzorků) (tab. 3).

Pro vizuální hodnocení byla sestavena obrázková tabulka (tab. 4). Vizuální zhodnocení bylo použito zejména v případech, kdy jedna gonáda obsahovala buňky v různých vývojových stádiích. Poté byla rovněž pro vyhodnocení rozhodující plocha buněk u jednotlivých stádií.

Tab. 3 Vyhodnocovací tabulka dle velikosti pohlavních buněk

vývojové stádium	jikernačka	velikost oocytů [μm]²
I	oogonie	< 140
II	perinukleolární stádium	140 - 200
III	stádium kortikálních alveol	200 - 250
IV	časná a pozdní vitelogenní fáze	< 1 200
vývojové stádium	mlíčák	velikost spermatocytů [μm]³
I	spermatogonie	6 - 8
II	spermatogonie, jen částečně spermatocysty se spermatidami	2 - 6
III	všechna stádia spermatogeneze	3 - 12
IV	především spermatidy	2 - 3

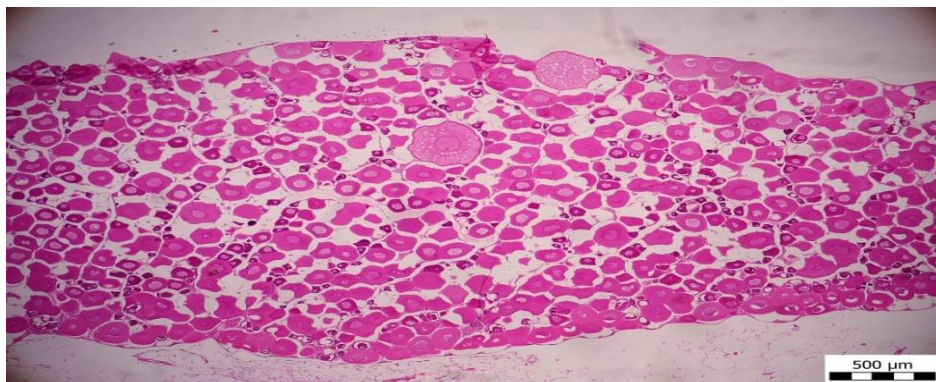
²V poslední fázi pohlavního vývoje jikernačky se nachází několik vývojových stádií

³U mlíčáků se jednotlivá vývojová stádia velikostí překrývají, ve III vývojovém stádiu jsou buňky podlouhlejší, vlivem kondenzace jádra a vzniku akrozomu a bičíku se protahují (Tumová, ústní sdělení)

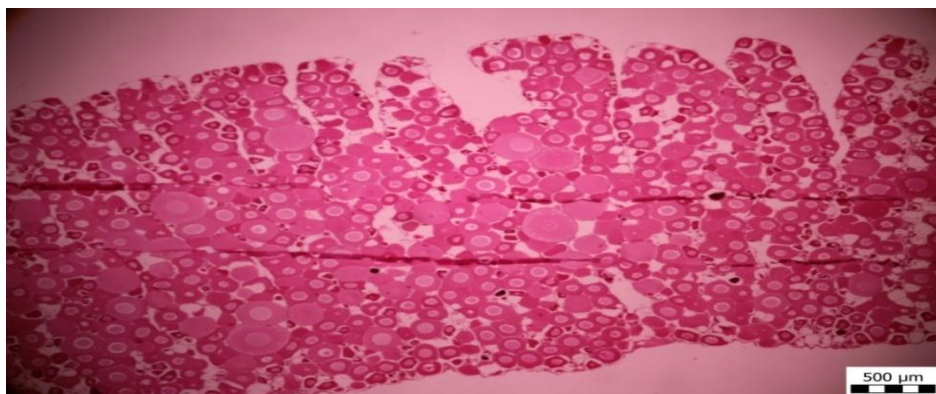
Tab. 4
stádium
vývoje

Vývojová stádia pohlavních buněk u obou pohlaví pro vizuální stanovení
řez gonádami jikernačky

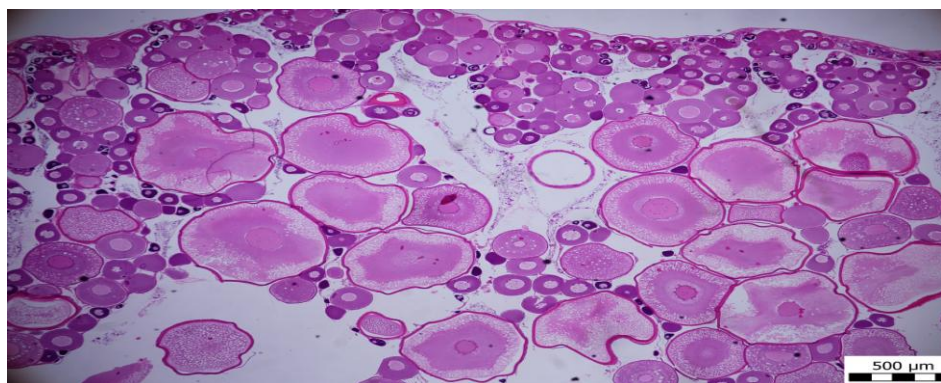
I



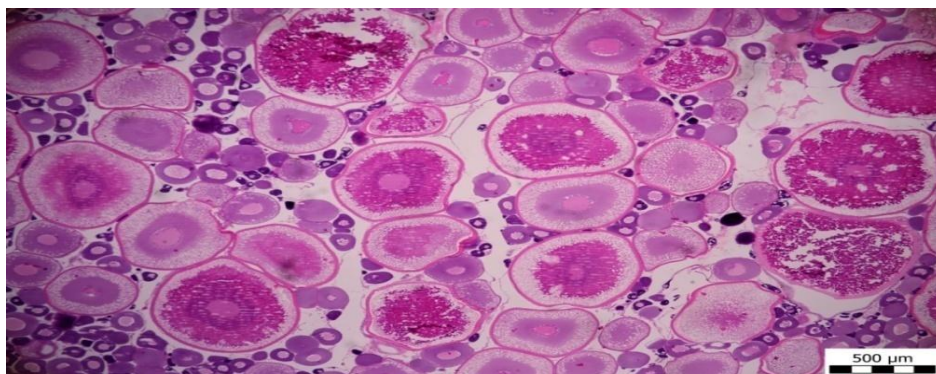
II



III



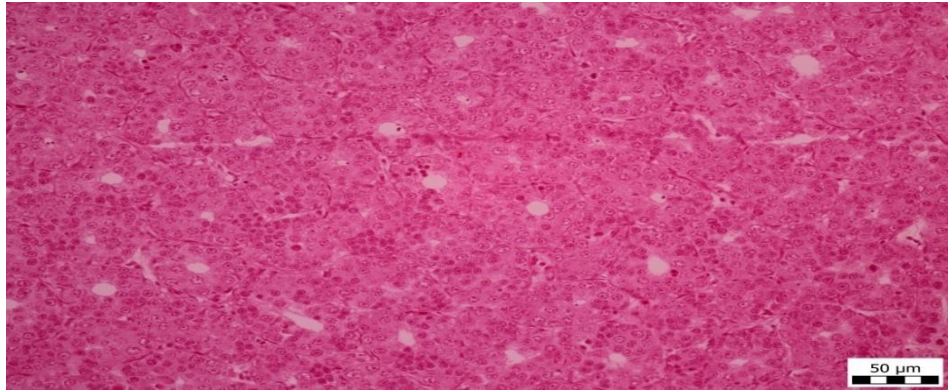
IV



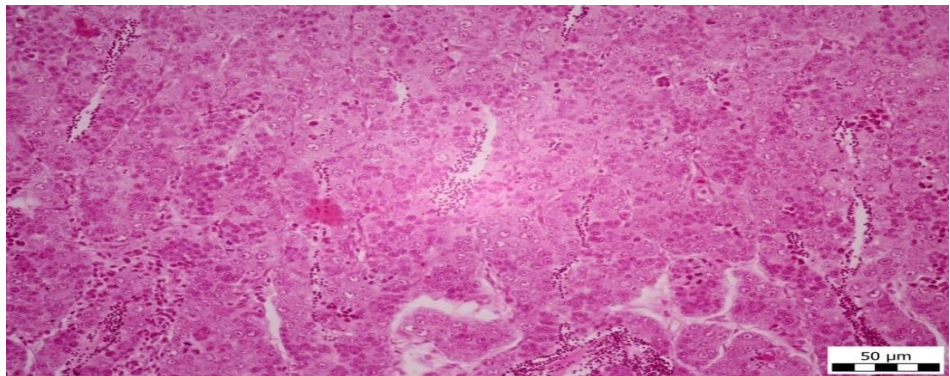
vývojové
stádium

řez gonádami mličky

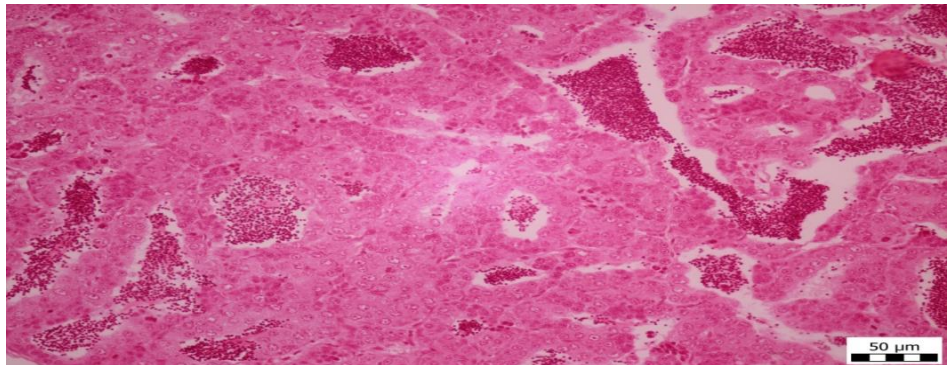
I



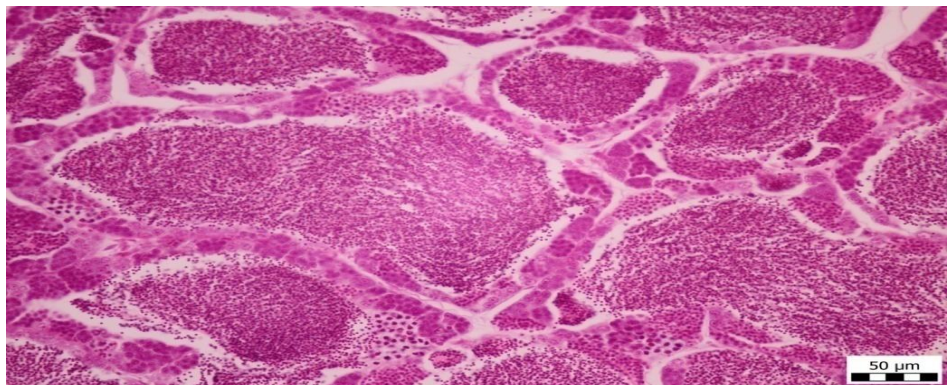
II



III



IV



3.4 Zpracování a statistické vyhodnocení dat

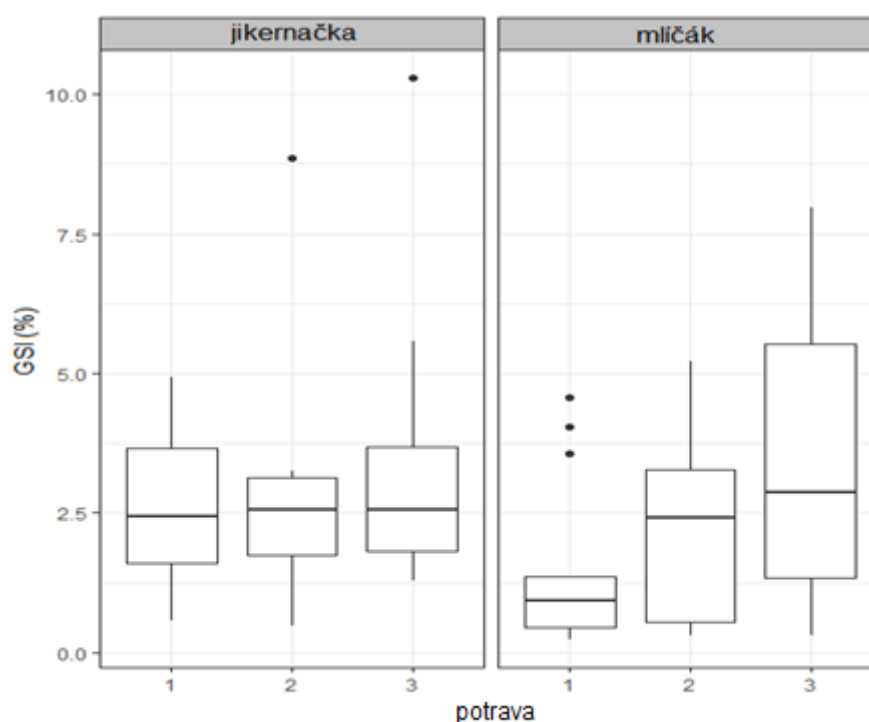
Normalita dat byla testována v programu R a stejně tak analýzy vlivu potravy na gonadosomatický index či plochu pohlavních buněk (Linear mixed - Effects models, přičemž potrava: faktor s pevným efektem, který je nadřazený náhodnému faktoru: akvárium). Krabicové grafy, střední čára = medián, hranice boxu 25 a 75 % kvantilu, vousky boxu 1,5krát vzdálenost mezi 25 a 75 kvantilem.

Plocha pohlavních buněk byla vypočítána po zjištění lineární závislosti buněk v programu Microsoft Excel 2007. Pro dosažení normality dat, byla plocha buněk zlogaritmována přirozeným logaritmem. Vliv potravy na četnost jednotlivých vývojových stádií pohlavních buněk jikernaček a mlíčáků byl vyhodnocen v programu Microsoft Excel 2007 a programu Statistica 12 (Pearsonovy kontingenční tabulky s chí kvadrátem).

4. Výsledky

4.1 Vliv potravy na gonádosomatický index

Potrava statisticky průkazně neovlivnila gonádosomatický index (GSI) ($F_{2,3} = 2,80139$, $p = 0,2059$) a interakce mezi pohlavím a dietou v závislosti na GSI (potrava: pohlaví) také není průkazná ($F_{2,51}=0,36583$, $p =0,6954$). GSI jikernaček (průměrné hodnoty: potrava 1: $2,64 \pm 1,58$ %; potrava 2: $3,21 \pm 2,93$ %; potrava 3: $3,52 \pm 2,87$ %) byl na první pohled srovnatelný ve všech variantách pokusu (graf 1). U mlíčáků je vidět určitá tendence vyššího GSI u variant s podílem přirozené potravy ve srovnání s GSI mlíčáků krměných výlučně umělou potravou (průměrné hodnoty: potrava 1: $1,46 \pm 1,52$ %; potrava 2: $2,29 \pm 1,62$ %; potrava 3: $3,50 \pm 2,72$ %). Srovnání mediánu (graf 1) a průměru hodnot (z textu) GSI, u jikernaček a mlíčáků, nalezneme v tab. 5.



Graf 1 Gonádosamatický index (GSI) u jednotlivých variant potravy na obě pohlaví

Tab. 5 Hodnoty mediánu a průměru hodnot GSI (%) u obou pohlaví

jikernačka				mlíčák			
potrava	medián	průměr	SD	potrava	medián	průměr	SD
1	2,45	2,64	1,58	1	0,93	1,46	1,52
2	2,56	3,21	2,93	2	2,42	2,29	1,62
3	2,56	3,52	2,87	3	2,88	3,50	2,72

4.2 Vliv potravy na stádium vývoje pohlavních buněk

Složení potravy signifikantně ovlivnilo zastoupení jednotlivých stádií vývoje pohlavních buněk jak u jikernaček ($\chi^2 = 23,0476$, sv = 6, p = 0,016318), tak i u mlíčáků ($\chi^2 = 15,5605$, sv = 6, p = 0,000781). Absolutní četnosti u jednotlivých stádií vývoje pohlavních buněk jsou znázorněny u jikernaček (tab. 6) a u mlíčáků (tab. 7). U jikernaček nebyl vliv potravy tak výrazný jako u mlíčáků, nicméně došlo ke zřetelnému snížení podílu pohlavních buněk ve II. vývojovém stádiu u potravy zahrnující přirozenou složku (*Daphnia* sp.). U pohlavních buněk mlíčáků je vidět zřetelná tendence ke zvyšování podílu vývojového stádia III (s nárůstem podílu přirozené potravy) a úbytek vývojového stádia I (tab. 7).

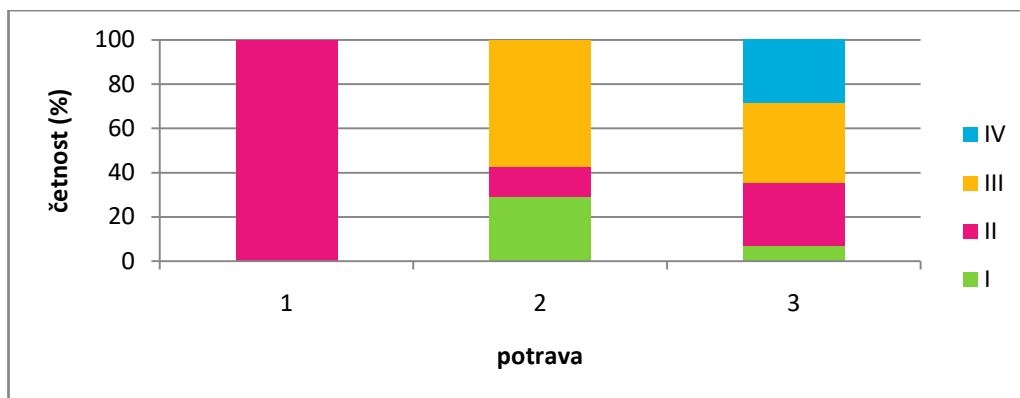
Tab. 6 Kontingenční tabulka absolutních četností jednotlivých stádií pohlavních buněk u jikernaček. Červeně jsou označeny signifikantní rozdíly

potrava	I	II	III	IV	součet řádku
1	0	11	0	0	11
2	2	1	4	0	7
3	1	4	5	4	14
vš. skupiny	3	16	9	4	32

Tab. 7 Kontingenční tabulka absolutních četností jednotlivých stádií pohlavních buněk u mlíčáků. Červeně jsou označeny signifikantní rozdíly

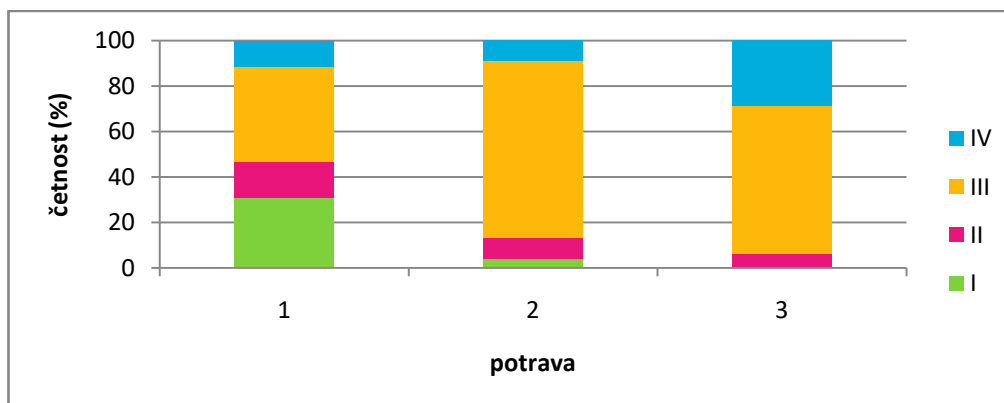
potrava	I	II	III	IV	součet řádku
1	8	4	11	3	26
2	1	2	18	2	23
3	0	2	11	5	18
vš. skupiny	9	8	40	10	67

U jikernaček krmených výlučně umělou potravou (potrava 1) se vyskytovalo jen II. vývojové stádium. V obou dalších variantách, kde byly jikernačky krmeny i přirozenou potravou se objevila první tři vývojová stádia (I - III), přičemž v obou variantách potravy (2 i 3) převládalo vývojové stádium III. Pohlavní buňky jikernaček palem krmených převahou přirozené potravy byly i ve IV. vývojovém stádiu (28,5 %). Pohlavní buňky jikernaček v tomto posledním vývojovém stádiu se u ostatních variant potravy (1 a 2) nevyskytovaly (graf 2).



Graf 2 Procentické zastoupení vývojových stádií pohlavních buněk jikernaček krměných různou potravou

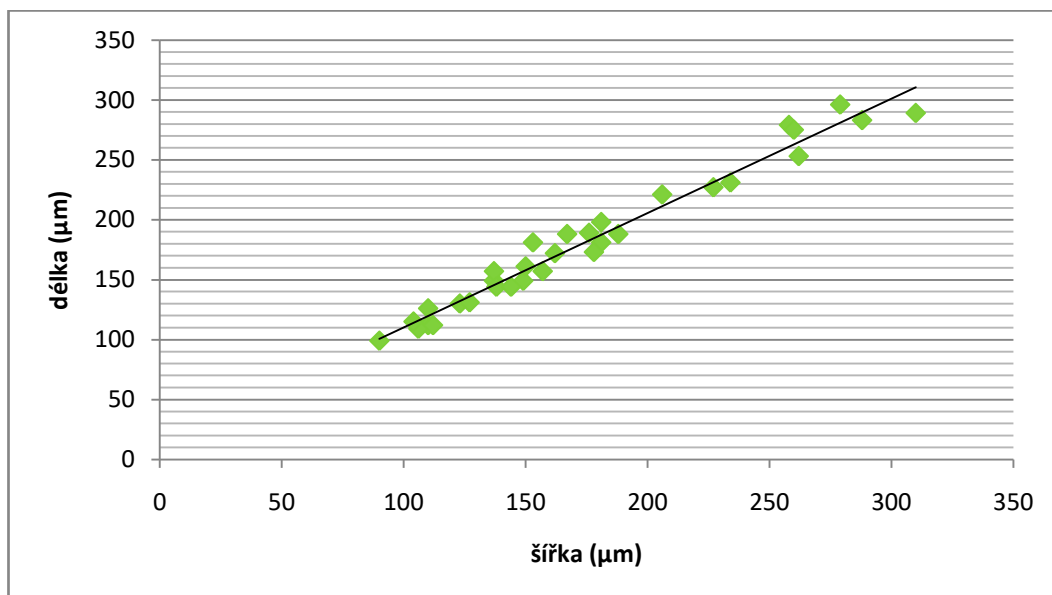
Všechna vývojová stádia pohlavních buněk byla nalezena u mlíčáků parem krměných výlučně umělým krmivem (Caprico, potrava 1) či potravou s převahou umělého krmiva (potrava 2: 65 % Caprico a zbytek *Daphnia* sp.). Nicméně u mlíčáků krměných potravou 2 bylo zastoupení vývojového stádia I a II nižší než u mlíčáků krměných výlučně umělým krmivem. Naopak vývojové stádium III se stalo dominantním. Žádné pohlavní buňky mlíčáků parmy krměné potravou 3 (převážně *Daphnia* sp.), nebyly již na konci pokusu v I. stádiu vývoje. Podobně jako u potravy 2, vývojové stádium III převažovalo i v této variantě pokusu a IV. stádium vývoje tvořilo 30 % z celkové četnosti (graf 3).



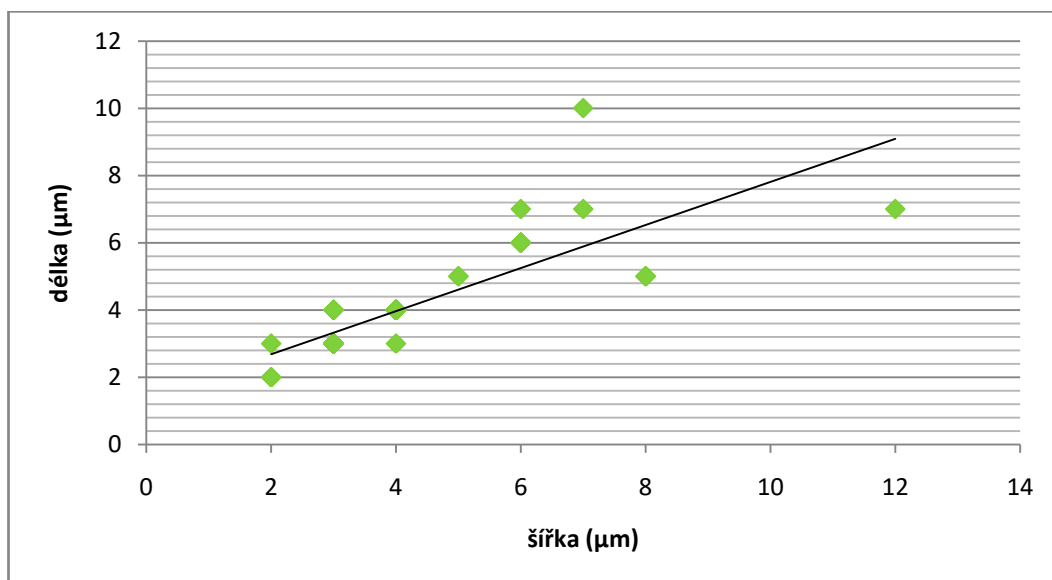
Graf 3 Procentické zastoupení vývojových stádií pohlavních buněk mlíčáků krměných různou potravou

4.3 Vliv potravy na velikost pohlavních buněk

Délka a šířka pohlavních buněk spolu, dle hodnoty R^2 , dobře korelovala, a to jak u jikernaček (graf 4) tak u mlíčáků (graf 5). U mlíčáků je patrné, že vzájemná závislost těchto dvou morfologických parametrů pohlavních buněk nebyla tak těsná jako u jikernaček.

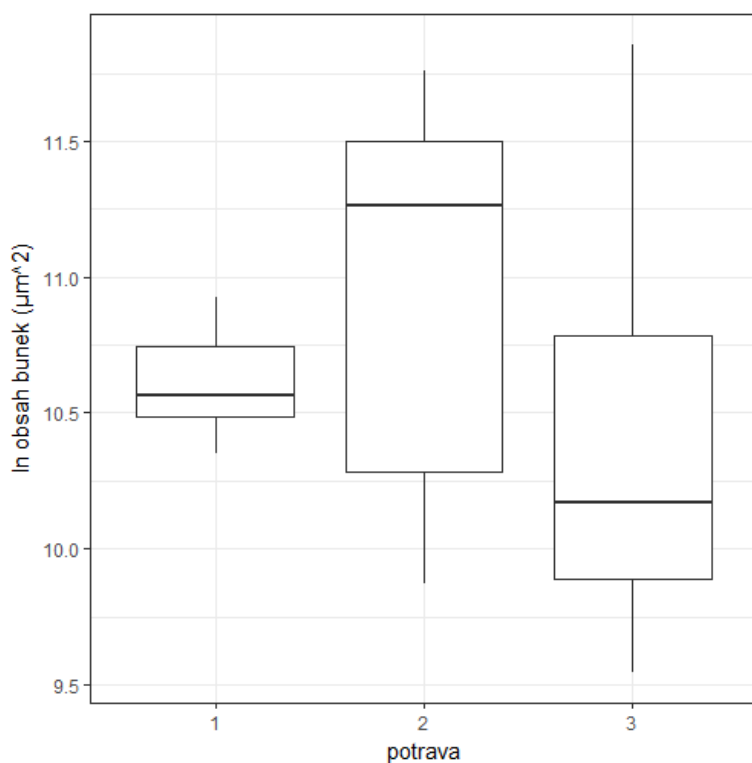


Graf 4 Lineární závislost průměrné délky a šířky pohlavních buněk (μm) u jikernaček ($R^2 = 0,970$)

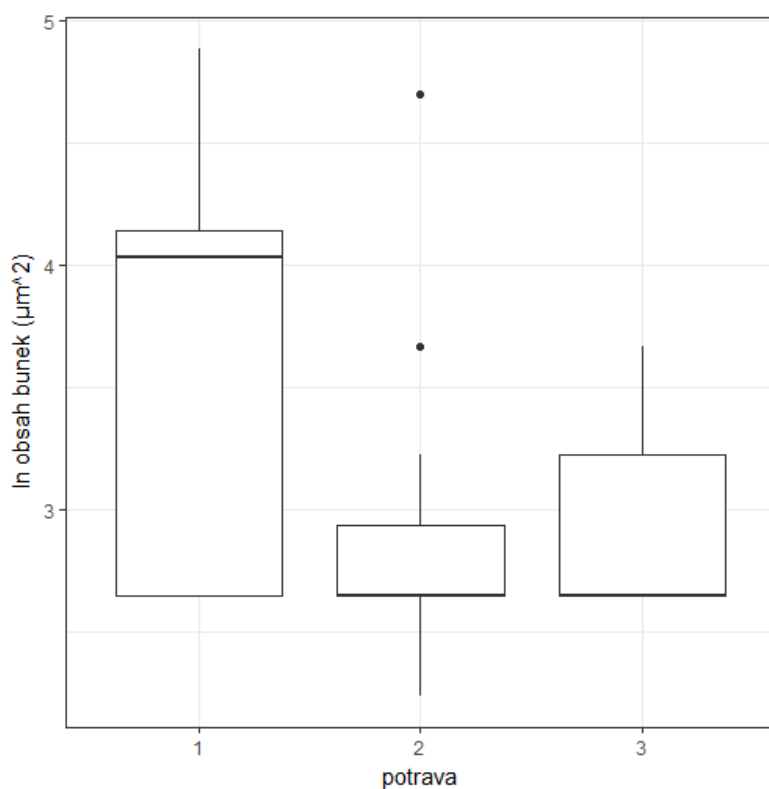


Graf 5 Lineární závislost průměrné délky a šířky pohlavních buněk u mlíčáků ($R^2 = 0,656$)

Potrava statisticky významně neovlivňovala velikost (plochu) pohlavních buněk ani u jikernaček ($F_{2,3} = 1,0$, $p = 0,5264$) ani u mlíčáků ($F_{2,3} = 4,3$, $p = 0,1326$) (grafy 6 a 7). Průměrná plocha (ln) pohlavních buněk jikernaček byla největší ve variantě krmené převahou umělé potravy (potrava 2: $10,95 \pm 0,82 \mu\text{m}^2$) (graf 6). Nicméně (nezralé) buňky mlíčáků krmených výlučně umělou potravou byly v průměru větší než u ostatních variant (průměrné hodnoty ln: potrava 1: $3,59 \pm 0,78 \mu\text{m}^2$; potrava 2: $2,92 \pm 0,61 \mu\text{m}^2$; potrava 3: $2,95 \pm 0,36 \mu\text{m}^2$), ale jejich plocha byla zároveň také nejvíce variabilní (graf 7). Srovnání mediánu (grafy 6 a 7) a průměru hodnot (z textu) a ln obsahu buněk (μm^2) u obou pohlaví nalezneme v tab. 8.



Graf 6 Vliv potravy velikost plochy pohlavních buněk (μm^2) jikernaček



Graf 7 Vliv potravy na velikost plochy pohlavních buněk (μm^2) mlíčáků

Tab. 8 Srovnání mediánu a průměru hodnot ln plochy pohlavních buněk (μm^2) u obou pohlaví

jikernačka				mlíčák			
potrava	medián	průměr	SD	potrava	medián	průměr	SD
1	10,56	10,61	0,20	1	4,03	3,59	0,78
2	11,26	10,95	0,82	2	2,65	2,92	0,61
3	10,17	10,50	0,81	3	2,65	2,95	0,37

5. Diskuze

Na základě vyhodnocení 60 vzorků gonád parmem nebyl prokázán statisticky významný vliv potravy na hodnotu GSI ani u jikernaček ani u mlíčáků. Tyto výsledky jsou plně v souladu se závěry Policar a kol. (2007), kteří krmili jikernačky parmy také umělým krmivem Caprico a jeho kombinacemi s přirozenou potravou (*Daphnia* sp.: 22 % a 40 %). I přesto, že vliv přídatku přirozené potravy byl statisticky neprůkazný, jak výsledky našeho pokusu, tak pokusu Policar a kol. (2007) ukazují, že je zde tendence vyššího GSI palem krmených převahou (či nejvyšším podílem) přirozené potravy. Hodnota GSI jikernaček byla nejvyšší ($3,52 \pm 2,87$ %), když v potravě převládala přirozená potrava (*Daphnia* sp.) a naopak nejnižší ($2,64 \pm 1,58$ %), když byly parmy krmeny výlučně umělou potravou 1. Podobně tomu bylo i u GSI mlíčáků, kdy rozdíl průměrů GSI mlíčáků krmených výlučně umělou potravou a potravou s převahou přirozené složky, byl ještě větší než u jikernaček (2,04 %). Neprůkaznost vlivu potravy na GSI mlíčáků byla tak zřejmě dána velkou variabilitou hodnot, a to zejména ve skupině 3, krmené převahou přirozené potravy. Vyšší podíl přirozené potravy u takto krmených ryb má pozitivní vliv na vyšší hodnotu GSI než u ryb krmených výhradně komerčním krmivem. Hodnotu GSI (těsně před ovulací), kterou uvádí ve své práci Poncin (1996) jikernačky v našem pokusu neměly. Tento autor uvádí dle své klasifikace, že jikernačky se ve IV. vývojovém stádiu prezentovaly GSI kolem 12,9 %. Hodnota GSI je závislá především na kvalitě vody, teplotě a dostupnosti kvalitní potravy (EPD, 2005).

Hodnota GSI není důležitá jenom pro stanovení pohlavní zralosti ryb a následnému zarybnění toků jak se tím zabývají autoři v evropských zemích. V Indii, v regionu Maharashtra byla zkoumána hodnota GSI u parmy carnatské (*Barbodes carnaticus*), která je levným a chutným zdrojem jídla pro tamní obyvatelstvo, které nemá na jídlo dostatek finančních prostředků⁴. Proto je nutno produkovat tuto rybu ve velkých objemech. Bylo zjištěno, že nejvyšší hodnoty GSI (18 %) dosahovaly ryby obou pohlaví v květnu až září (v době rozmnožování). S gonadosomatickým indexem byl současně sledován HSI (hepatosomatický index), který koreloval s GSI. Reprodukční schopnost ryb je tedy ovlivněna kvalitními životními podmínkami, ty značí dobrý vývoj jater. Ve zralých buňkách se vyskytovala i zvýšená hladina bílkovin a lipidů. Tyto látky jsou pro rybu velmi

⁴ Indie se řadí mezi země s nejnižší průměrnou mzdou ve světě (Světaznalec, 2017)

důležité, protože rozmnožování je velmi energeticky náročný proces (Shodganga, 2017).

Jikernačky krmené výlučně umělou potravou měly ve svých gonádách všechny pohlavní buňky v I. vývojovém stádiu. Naopak u jikernaček krmených potravou 3 (s převahou přirozené složky) byla větší část (36 %) pohlavních buněk ve III. vývojovém stádiu. Navíc pouze u této pokusné varianty měly jikernačky pohlavní buňky v posledním, tj. IV. vývojovém stádiu. V tomto vývojovém stádiu bylo 28,5 % buněk. Stejně procentuální zastoupení mělo i II. vývojové stádium. Podobně pozitivní vliv přídavku přirozené potravy na vývoj pohlavních buněk parem uvádějí i Policar a kol. (2007). I když odlišnosti procentuálního zastoupení jednotlivých vývojových stádií pohlavních buněk nebyly tak významné, jako v našem pokusu. Například jikernačky krmené výlučně umělou potravou měly pohlavní buňky nejen v I. vývojovém stádiu (83 %), ale i ve druhém (17 %). To mohlo být způsobeno stářím ryb, kdy v pokusu Policar a kol., (2007) používali ryby staré 12 měsíců a obsah kyslíku ve vodě byl o 0,5 % vyšší než v pokusu Policar a kol. (rukopis v přípravě). Policar a kol. (2007) dále uvádějí, že ve variantách s přídavkem přirozené potravy největší procento pohlavních buněk (50 %) bylo ve III. stádiu vývoje. Poslední stádium vývoje nebylo ve vaječnicích nalezeno. Důvodem tohoto zjištění může být podíl přirozené složky v potravě. V pokuse provedeném Policar a kol. (2007), na rozdíl od našeho pokusu, v žádné z variant přirozená potrava nepřevažovala. Nejvíce tvořila 40 % hmotnosti předkládané potravy.

Celkově se u mlíčáků, se zvýšeným podílem přirozené složky potravy, ještě významněji než u jikernaček, zvyšoval podíl zralých pohlavních buněk a ubývalo těch v I. vývojovém stádiu. Zatímco gonády mlíčáků krmených buďto výlučně umělou potravou nebo potravou s převahou umělé složky (potrava 1 a 2) obsahovaly pohlavní buňky všech vývojových stádií, tak v potravě 3 (s převahou přirozené složky) již nebyly zaznamenány buňky v I. vývojovém stádiu. Nicméně ve všech variantách pokusu bylo největší procento pohlavních buněk mlíčáků ve třetím vývojovém stádiu (potrava 1: 42 %, potrava 2: 78 % a potrava 3: 65 %). Policar a kol. (2007) uvádějí IV. stádium vývoje pohlavních buněk mlíčáků ve všech krmných skupinách, s tím, že jeho podíl rostl na úkor I. stádia vývoje.

Rozdílné výsledky zralosti pohlavních buněk jikernaček parem mezi naším pokusem a prací Policar a kol. (2007) je možno vysvětlit odlišnou klasifikací vývojových stádií. Vývojová stádia pohlavních buněk jikernaček byla stanovena dle stanovené vyhodnocovací tabulky (tab. 3) spolu s vizuálním stanovením vývojových stádií (tab. 4) a rozdílným měřením pohlavních buněk (viz. kap. 3.3). Policar a kol. (2007) vyfotografovali z jednoho vzorku gonád pět snímků a v každém snímku bylo změřeno 50 buněk (celkem 250 měřených buněk). Pokud by byly buňky měřeny náhodně, podvědomě člověk vybírá buňky podobného charakteru (stejně velikosti). Při pořizování snímků je možný překryv fotografií (není jasné, kde začíná první a kde končí druhý snímek) a tak vzniká pravděpodobnost opakovaného měření stejných buněk, tudíž i stejných stádií vývoje. Vzhledem k postupnému dozrávání oocytů, při výtěru parmy, nemuselo být IV. stádium dostatečně procentuálně zastoupeno (Baruš a Oliva, 1995). V našem pokusu bylo proto přihlédnuto i k vizuálnímu stanovení (jak vypadá reprezentativní část gonády celkově). Buňky nižších vývojových stádií by měly jinak taktéž vyšší procentuální zastoupení než buňky IV. vývojového stádia, které jsou větší (až 2 mm) ale je jich méně.

Méně významný vliv přídatku přirozené potravy na vývoj pohlavních buněk jikernaček než mlíčáků je možné vysvětlit nižší energetickou hodnotou a nižším podílem proteinů v potravě, který by mohl být vzhledem ke stáří jedinců v pokusu o několik procent vyšší (Jirásek a kol., 2005).

I když délka a šířka pohlavních buněk jikernaček i mlíčáků dobře korelovala, pro hodnocení velikosti pohlavních buněk byla použita plocha elipsy. Pohlavní buňky jikernaček by bylo možné s určitými nepřesnostmi (někdy je při dělení příliš mnoho buněk a tvar je mírně deformován) považovat za koule a použít tedy průměr buněk. Nicméně u mlíčáků jsou během spermiogeneze časné spermatidy okrouhlé buňky s kulatým jádrem. Během přeměny v pozdní spermatidy dochází ke kondenzaci jádra a k tvorbě akrozomu a bičíku, buňky se protahují do délky a ztrácejí svůj kulovitý tvar (Tumová, ústní sdělení). Pro zjištění vlivu potravy na pohlavní buňky jikernaček a mlíčáků, byla proto jednotně zvolena plocha. Vliv potravy na ln velikost plochy pohlavních buněk u jikernaček a mlíčáků nebyl statisticky prokazatelný vzhledem k velké variabilitě dat. U jikernaček a mlíčáků byl ln plochy (μm^2) největších a nejmenších buněk (nejzralejších) v potravě 2.

Při mikroskopickém zpracování vzorků bylo zjištěno, že gonády parem krmených potravou s převahou umělé složky (potrava 2), měly na první pohled více tukové tkáně. Vyšší tučnost gonád zaznamenal i Polícar a kol. (2007) u parem krmených výlučně umělou potravou nebo její významnou převahou (78%). Poncin (1989) nebo Philippart a kol. (1989), kteří využili více energetické krmivo než v naší práci a v práci Polícar a kol. (2007), se o problému přetučněných gonád ve svých publikacích nezmiňují.

Některé vzorky gonád nebyly zpracovány, z důvodu výskytu intersexu, který je u parem pocházejících z umělého výtěru neobvyklý (ryby pocházely z pokusu Polícar a kol., 2007b). Intersex byl zkoumán v práci Peňáz a kol., (2002b) v řece Jihlavě během 25 let. V úseku řeky byla zaznamenána signifikantní převaha samců nad samicemi, to podnítilo úvahy o možném výskytu intersexu. Tato hypotéza byla testována třemi různými způsoby. Prokazatelně byli zjištěni intersexuální jedinci, ve znečištěném úseku řeky Jihlavy komunálními odpadními vodami města Třebíče. Při makroskopickém zkoumání byli identifikováni jako samci, avšak při detailnějším zkoumání jednotlivých segmentů řezu gonádou byly zaznamenány oocyty buď ojedinele, nebo ve shlucích v celém řezu varletem. Stejně tak jako v našem případě. Tento jev však nebyl kvantifikován, stejně jako přetučnost gonád. Protože oba jevy nám mohou objasnit vliv potravy a vnějšího prostředí na dřívější pohlavní dospělost parmy obecné, měly by být dále zkoumány.

Vliv potravy byl prokázán na vývoj pohlavních buněk ve smyslu urychlení pohlavní dospělosti. Avšak pro lepší průkaznost by bylo lepší použít krmivo s vyšší energetickou hodnotou a vyšším obsahem bílkovin, které použili již výše zmínění Poncin (1989) nebo Philippart a kol. (1989). Statisticky neprůkazné výsledky v prokázání vlivu potravy na rychlejší vývoj gonád u jikernaček a mlíčáků lze vysvětlit původem parem, které byly použity v pokusu od Polícar a kol., 2007b, kdy byly juvenilní parmy krmeny buďto naupliem *Artemia* sp. nebo umělým krmivem Asta. Není známo, jak dlouho a na jakém krmivu byly ryby adaptovány, než byly použity v pokusu Polícar a kol., (rukopis v přípravě). Statistická neprůkaznost pokusu mohla být ovlivněna i rozdílným zastoupením pohlaví (jikernaček a mlíčáků) v jednotlivých krmných skupinách. Celkovým zvýšením počtu jedinců (zejména jikernaček) a početně stejným zastoupením obou pohlaví, by se některé trendy mohly stát statisticky průkazné.

6. Závěr

Vliv přídavku přirozené potravy (*Daphnia* sp.) na gonadosomatický index ani na plochu pohlavních buněk jikernaček a mlíčáků parmy obecné nebyl prokázán. Nicméně mlíčáci krmeni potravou obsahující přirozenou složku měli GSI $2,29 \pm 1,62$ % (potrava 2) a $3,50 \pm 2,72$ % (potrava 3) oproti mlíčákům krměným výlučně umělou potravou (GSI $1,46 \pm 1,52$ %). GSI jikernaček dosahovalo podobných hodnot jako u mlíčáků, avšak s menšími procentuálními rozdíly mezi variantami. Naopak plocha pohlavních buněk měla tendenci být vyšší ve variantách krměných buďto výlučně umělou potravou (jikernačky), či potravou s její převahou (mlíčáci).

Vzhledem ke svým pozitivním účinkům na dosaženou zralost pohlavních buněk u jikernaček i mlíčáků, který má vyšší podíl přirozené potravy v krmivu a s optimálními parametry pro odchov ročka parmy obecné (dle Krupka, 1987), má parma naději být opět jedním z dominantních druhů naší ichtyofauny. Avšak z ekonomického hlediska je odchov parmy obecné od juvenilních jedinců do její (i dřívější) pohlavní zralosti finančně náročnější než výtěr generačních ryb získaných z volných vod na trdlišti a následný odchov plůdku. Juvenilní parmy stráví totiž v recirkulačním zařízení jen několik týdnů, než se navrátí do řek.

7. Použité zdroje

7.1 Tištěné a elektronické zdroje

1. Alavi, S., M., Hadi, Pšenička, M., Policar, T., Rodina, M., Kozák, P., Linhart, O., (2008): *Sperm characteristics in *Barbus barbus* as a function of nutrition throughout the reproductive season*. *Cybium*, 32(2) suppl.
2. Bănărescu, P.,M., Bogutskaya, N., G., (2003): *The freshwater fishes of Europe. Vol. 5 - Cyprinidae 2, part II Barbus*, Wiesbaden: Aula-Verlag, 454 s.
3. Baruš, V., Oliva, O.,(1995): *Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes)*, 2. díl, 1. vydání. Praha: il. Baradlaiová M., Akademie věd České republiky, 698 s.
4. Čechová, E., (2012): *Stanovení estrogenů v odpadních vodách*. Brno, diplomová práce. PřF MUNI. Vedoucí práce Doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.
5. Český rybářský svaz, (2017a): *Statistika úlovků* [online]. [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: http://www.rybsvaz.cz/?page=reviry%2Fstatistiky&lang=cz&statistiky_typ=vse
6. Český rybářský svaz, (2017b): *Počet členů organizace ČRS* [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: http://www.rybsvaz.cz/?page=home&lang=cz&home_menu=ano
7. ČRS ČB, (2017): *Pravidla rybolovu*. [online]. [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.crs cb.cz/pravidla-rybolovu/>
8. Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., (2003): *Obecné rybářství*. 1. vydání. Informatorium, Praha, 308 s.
9. Dvořák, J., (1982): *Uměly vytěr a odchov parmy*. *Rybářství*, (3), 53 – 54 s.
10. Dyk, V., (1977): *Naléhavá potřeba repopulace parmy obecné*. *Rybářství*, 147 - 148 s.
11. Dyk, V., Podubský, V., Štědronský, E., (1949): *Umělý chov ryb*, Brno: Studentská organizace veterinárních mediků.
12. EPD, (2005): *GSI a ryby*. [online]. [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: http://www.epd.gov.hk/epd/mobile/english/environmentinhk/water/marine_quality/bio_cf05.html

13. Genten, F., Terwinghe, E., Danquy, A., (2009): *Atlas of fish histology*. Enfield: Science Publishers, 215 s.
14. Hanel, L., (1995): *Ochrana ryb a mihulí*. Vlašim: Český svaz ochránců přírody. Metodika Českého svazu ochránců přírody.
15. Hanel, L., Lusk, S., (2005): *Ryby a mihule České republiky: rozšíření a ochrana*. Vlašim: Český svaz ochránců přírody, 447 s.
16. Hochman, L., (1963): *Zkusme získat vlastní plůdek parmy*. Čs. rybařství, (2), 23 – 24 s.
17. Horáková, M., Lischke P., Grünwald, A., (1989): *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. 1.vyd., Praha: SNTL., 389 s.
18. ISOP, (2017): *Červený seznam ČR*. [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: http://portal.nature.cz/publik_syst/ctihtmlpage.php?what=1264
19. Jirásek, J., Mareš, J., Zeman, L., (2005). *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro ryby*. 2. vyd. Brno: MZLU
20. Kottelat, M., Freyhof, J., (2007): *Handbook of European freshwater fishes*, Cornol, Switzerland: Publications Kottelat
21. Krupka, I., (1987): *Umělý výtěr a odchov plůdku parmy*. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický. Edice Metodik č. 23.
22. Křivanec, (2017): *Rybí líheň pod Mrhalem*. [online]. [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.cesky-muskar.eu/archivPM/ochrana/lihne/prispevek01.html>
23. Lusk, S., Baruš, V., Vostradovský, J., (1983): *Ryby v našich vodách*. Praha: Academia. Živou přírodou., 212 s
24. Lusk, S., (1996): *Development and status of populations of *Barbus barbus* in the waters of the Czech Republic*. Folia Zoologica, 45 (suppl. 1), 39 – 46 s.
25. Lusk, S., Hartvich, P., Lojkásek, B., (2011): *Migrace ryb a migrační prostupnost vodních toků*. In: Lusk, S.; Lusková, V., (eds.). Biodiverzita ichtyofauny České republiky (VIII): Biodiversity of fishes in the Czech Republic. Vydání 1. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, 109 s.
26. Mareš, J., Jirásek, J., Brabec, T., Vítek, T., Tichý, T., (2006): *Zhodnocení produkční účinnosti krmiva s diferencovanou úrovní tuku při produkci ročka lína obecného (*Tinca tinca*) v podmínkách intenzivního chovu*. Sborník příspěv. IX. České ichtyologické konference, Vodňany. 85 - 88 s.

27. Mareš, J., Novotný, L., Palíková, M., (2015): *Akvakultura - základy výživy a krmení ryb*. Mendelova univerzita v Brně, [online]. [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.rybarstvi.eu/pub%20rybari/2015%20akvakultura.pdf>
28. Mareš, J., Hillerman, J., (2002). *Použití polovlhkých směsí v chovu okouna říčního (Perca fluviatilis L.)*. In: Spurný, P. (ed.), Sborník ref. V. České ichtyologické konference, Brno: 187 – 191 s.
29. Mareš, J., Jirásek, J. (1999): *Použití polovlhkých krmných směsí při odchovu plůdku sumce velkého (Silurus glanis L.)*. In: „ 50 let výuky rybářské specializace na MZLU v Brně, 143-147 s.
30. MRS, (2017): *Bližší podmínky výkonu rybářského práva na vodách mimopstruhových*, MRS, z.s., platný od 1. 1. 2016 - 31. 12. 2017, tištěná verze
31. Müller, H., (1987): *Fische Europas*. Leipzig - Radebeul : Neumann Verlag, 320 s.
32. Müllerová, H., Stejskal, V., (2013): *Ochrana zvířat v právu*. Praha: Academia
33. Nature, (2017): *Směrnice Rady č. 92/43/EHS*. [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <http://www.nature.cz/natura2000-design3/sub-text.php?id=6177>
34. Ošanec M., (2014): *Zhodnocení vlivu použitého krmiva na produkční ukazatele v systému intenzivního chovu lososovitých ryb*. Brno, diplomová práce. Vedoucí práce: prof. Dr. Ing. Jan Mareš
35. Peňáz, M., Baruš, V., Prokeš, M., (2002a): *Koncentrace těžkých kovů a změny u koncentrace rtuti ve svalovině parmy obecné z řeky Jihlavy*. Brno. V. Česká ichtyologická konference. Sborník referátů z vědecké konference s mezinárodní účastí, 253 - 258 s.
36. Peňáz, M., Baruš, V., Prokeš, M., Svobodová, Z., (2002b): *Změny některých atributů populace parmy obecné v řece Jihlavě během posledních 25 let a jejich příčiny*. Brno. V. Česká ichtyologická konference. Sborník referátů z vědecké konference s mezinárodní účastí, 5 - 10 s.
37. Philippart, J. C., (1982): *Mise au point de l'alevinage contrôlé du barbeau Barbus barbus (L.) en Belgique. Perspectives pour le rempoissinement des rivières*. Cah. Ethol. Appl. 2 : 173 - 202 s.
38. Philippart, Poncin, P., Melard, Ch., (1987): *La domestication du barbeau fluviatile, Barbus barbus (L.) (Cyprinidae) en vue de la production massive contrôlée d'alevins pour le repeuplement des rivières*. Résultats et problèmes.

- In: Tiews, K. (ed.): Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, 1: 227 -237 s.
39. Philippart, J.C., Poncin, P., Medard, Ch., (1986): *La domestication du barbeau fluviatile, Barbus barbus (L.) (Cyprinidae) en vue de la production massive controlée, d'alevins pour le repeuplement des rivières*. Resultats et problemes. Symposium CECPI / FAO sur la Selection, l'hybridation et le Genie genetique Appliques a aquaculture des Poissons, Mollusques et Crustaces, pour la Consommation et le Repeuplement Bordeaux, France.
40. Philippart, J.C., Medard, Ch., Poncin, P., (1989): *Intensive culture of the common barbel, Barbus barbus (L.) for restocking*. In: De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H, Wilkins, N. (ed.): Aquaculture – a biotechnology in progress. European Aquaculture Society, Breden, s. 483-491.
41. Pokorný, J., Adámek, Z., Dvořák, J., Šrámek, V., (2003): *Pstruhařství*, kap. 3.3, 3. vydání. Praha: Informatorium.
42. Policar, T., Kozak, P., Hamačkova, J., Kouřil, J., Vorličková, P., (2007a): *Odchov ročků parmy obecné (Barbus barbus L.) při použití různé potravy v kontrolovaných podmínkách*. Bulletin VÚRH Vodňany, ročník 43 (1), 3 - 15 s.
43. Policar, T., Kozak, P., Hamačkova, J., Lepičova, A., Musil, J., Kouřil, J. (2007b): *Effects of short-time Artemia spp. feeding in larvae and different rearing environments in juveniles of common barbel (Barbus barbus) on their growth and survival under intensive controlled conditions*. Aquatic Living Resources, 20: 175-183 s.
44. Poncin, P., 1989. *Effects of different photoperiods on the reproduction of the barbel, Barbus barbus (L.) reared at constant temperature*. Journal Fish Biology, 35: 395 - 400 s.
45. Poncin, P., Philippart, J., Melard, Ch., (1985): *Induction of repeated spawnings in female barbel, Barbus barbus (L.) (Pisces, Cyprinidae) reared in heated water*. In: Abstract of the 7 th Conference of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry (Fish Culture).
46. Poncin, P., Melard, Ch., Philippart, J., (1987): *Use of temperature and photoperiod in the control of the reproduction of 3 European cyprinids: Barbus barbus (L.) Leciscus cephalus (L.) and Tinca tinca (L.), reared in*

- captivity*. Preliminary results, Bulletin Francis de la Pêche. Pisciculture, 304: 1 - 12 s.
47. Poncin, P., Thiry, M., Lepoint, A., Philippart, J. C., 1996. *Histological and biometrical study of intraovarian oocytes in barbel (Barbus barbus) reared in captivity*. Folia Zoologica, 45 (suppl. 1), s117-121.
48. Rybářství Litomyšl, (2017): *O rybářství ve společnosti Rybářství Litomyšl s.r.o.* [online]. [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.lit.cz/rybarstvi/spodek.htm>
49. Shodhganga, (2017): *Hepatosomatic index and gonadosomatic index*, Chapter NO. 5, [online]. [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/27594/12/12_chapter%205.pdf
50. Spurný, P., Fiala, J., Mareš, J., (2004): *Intensive rearing of the nase Chondrostoma nasus (L.) larvae using dry starter feeds and natural diet under controlled conditions*. In Czech Journal of Animal Science 49, 444 - 449 s.
51. Světaznalec, (2017): [online]. *Mzda* [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <https://www.svetaznalec.cz/prumerna-a-minimalni-mzda-ve-svete/>
52. Sysová, J., (2001): *"Parmová cholera" - onemocnění u člověka*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, ročník 7, č. 9 - 10, 259 s.
53. Tatarčíková, (2006): *Když rybáři vracejí ryby do řek*. [online]. [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://naschov.cz/kdyz-rybari-vraceji-ryby-do-rek/>
54. Technická zpráva pilotního projektu, (2012): *Produkce plůdku ročka parmy obecné v intenzivních podmínkách přes zimní období*, řešitel: prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D., Vodňany
55. Veřejná správa, (2017): *Zákon 359/2012 Sb.* [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=78421&fulltext=359~2F2012~20Sb.&nr=&part=&name=&rpp=15>
56. Vladykov, V., (1931): *Les poissons de la Russie Sous - Carpathique (Tchécoslovaquie)*. Mém. Soc. Zool. France, 29 (4): 217-374 s.
57. Vobr, J., (2012): *Posouzení vlivu výživy kapra obecného (Cyprinus carpio L.) na změnu kvality masa*. České Budějovice, bakalářská práce: Vedoucí práce Ing. Vejsada Pavel, Ph.D.

58. Zákony pro lidi, (2017a): *Vyhláška č. 197/2004 Sb.* [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-197#p13>
59. Zákony pro lidi, (2017b): *Vyhláška č. 166/2005 Sb.* [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2005-166>

8. Přílohy

Příloha 1 Zkratky uvedené v tab. 1

zkratka	význam
LYS	lysin
ARG	arginin
HIS	histidin
ILE	isoleucin
LEU	leucin
VAL	valin
MET	methionin
CYS	cystein
PHE	fenylalanin
TYR	tyrosin
THR	tryptofan
ASP	kyselina asparágová
GLU	kyselina glutamová
SER	serin
GLY	glycin
ALA	alanin
PRO	prolin
SFA	nasycené mastné kyseliny
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	polynasycené mastné kyseliny
n - 3	omega 3 mastné kyseliny
n - 6	omega 6 mastné kyseliny