

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Odběr spermatu pomocí katetru a jeho využití při výtěru štiky
obecné (*Esox lucius* L.)

Autor: Bc. Tomáš Plaňanský

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Jiří Křišťan, Ph.D.

Studijní program a obor: Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: II

České Budějovice 2018

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:

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce doc. Ing. Tomáši Policarovi, Ph.D., za odbornou pomoc, poskytnuté rady, cenné připomínky a metodické vedení při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat MSc. Volodymyru Bondarenkovi, Ph.D., MSc. Borisovi Dzyubovi, Ph.D., Mgr. Sergeji Boryshopoletsovi, Ph.D. a MSc. Olexandru Malinovskemu a dále všem, kteří se podíleli na mém pokusu při umělém výtěru štiky obecné a při práci v laboratoři, díky nimž mohlo dojít k uskutečnění experimentu, získání výsledků a vypracování této diplomové práce.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš PLAŇANSKÝ**

Osobní číslo: **V16N010P**

Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**

Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**

Název tématu: **Odběr spermatu pomocí katetru a jeho využití při výtěru štiky obecné (*Esox lucius* L.)**

Zadávací 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 :

Štika obecná (*Esox lucius* L.) je hospodářsky zajímavým dravým druhem, který se vyskytuje v mnoha různých sladkovodních biotopech severní polokoule. Tento druh je velmi oblíbený v rámci sportovního rybolovu. Štika obecná se také hojně využívá v rámci extenzivního polykulturního chovu ryb v rybnících. V takovémto chovu má tento vrcholový predátor především za úkol potlačovat výskyt drobných a méně hospodářsky významných kaprovitých druhů ryb. Tržní ryby štiky jsou pro svoji kvalitní svalovinu velmi žádané u konečných konzumentů. V současné době se tržní ryby štiky obecné na evropském kontinentu produkují hlavně dvěma způsoby. Prvním způsobem této produkce je odlov divoce žijících štik ve velkých jezerech a řekách. Tímto způsobem bylo v Evropě za poslední desetiletí ročně vyprodukováno 17 700 - 24 500 tun tržních ryb. Vedle odlovu štiky obecné z volných vod je tento druh ryby tradičně produkován a chován již ve zmíněném extenzivním rybničním chovu, díky kterému se v Evropě celkem ročně vyprodukuje pouze 200 - 850 tun tržních ryb, což tedy představuje jen 3 - 10 % produkce získané lovem. Nejvýznamnějšími producenty štiky obecné chovem v rybnících byly v minulém desetiletí následující země: Rusko (4 - 280 t), Polsko (0 - 166 t), Česká republika (63 - 112 t), Bělorusko (40 - 122 t) a Maďarsko (28 - 83 t).

Produkce štiky obecné v rybniční akvakultuře je limitována především nedostatkem vhodných generačních ryb, nízkou efektivitou jejich reprodukce, neefektivní inkubací oplozených jiker a následným chovem všech věkových kategorií, který je zatížený vysokým kanibalismem. U reprodukce generačních ryb jsou největšími technologickými problémy: nefunkční indukce ovulace jiker pomocí syntetických hormonálních preparátů, nízká produkce spermatu a jeho kontaminace močí, následná nízká motilita spermií a nízká oplozenost získaných jiker. S cílem získat kvalitní nekontaminované spermie u umělých výtěrů štiky obecné se velmi často usmrcují mlíčáci, od kterých se odebírá a využívá testikulární sperma k oplození získaných jiker. Nevýhodou tohoto způsobu je ztráta generačních mlíčáků bez možnosti jejich opakovaného použití k reprodukci.

Diplomová práce bude optimalizovat management generačních ryb s cílem produkovat dostatečné množství kvalitních pohlavních buněk. Především u mlíčáků bude testován způsob odběru spermatu pomocí speciálního katetru. Při odběru spermatu katetrem a bez něj (sperma bude získáváno klasickým vytlačáním) bude sledováno odebírané množství a následně hodnocena a porovnána kvalita spermií u ryb hormonálně ošetřených kapří hypofýzou. Vzorky čerstvého spermatu odebraného katetrem či bez něj budou dále využity k oplození vzorků získaných jiker. U vzorků oplozených jiker bude následně sledován vliv různě odebraného spermatu na oplozenost jiker, líhivost a kvalitu larev.

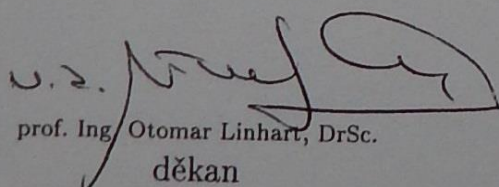
Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné literatury:

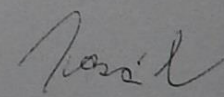
- Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2009. Morfologie spermií, složení seminální plazmy, motilita a parametry zvlnění bičsku spermie u štiky obecné (*Esox lucius*). Bulletin VÚRH Vodňany, 45: 3 - 9.
- Billard, R., 1996. Reproduction of Pike: gametogenesis, gamete biology and early Development. In: Craig, J.E. (Ed.), Pike - biology and exploitation. Chapman and Hall, London: 13 - 67.
- Bondarenko, V., Drozd, B., Policar, T., 2015. Effect of water temperature on egg incubation time and quality of newly hatched larvae of northern pike (*Esox lucius* L., 1758). Journal of Applied Ichthyology, 31 (Suppl. 2): 45 - 50.
- Bondarenko, V., Podhorec, P., Svinger, V., Policar, T., 2015. Evaluation of different treatments for induction of ovulation in Northern pike (*Esox lucius* L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 15: 581 - 587.
- Bondarenko, V., Křišťan, J., Švinger, V., Policar, T., 2014. Reprodukce a odchov rychleného plůdku štiky obecné (*Esox lucius*). Edice Metodik (Certifikovaná metodika), FROV JU Vodňany 144: 54 s.
- Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Characteristics of stripped and testicular Northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. Aquat. Living Resour., 21: 207 - 212.
- Hulák, M., Rodina, M., Linhart O., 2008. Charakteristika vytřeného a testikulárního spermatu štiky obecné (*Esox lucius* L.): motilita a rychlost spermií. Bulletin VÚRH Vodňany, 44, 3 - 9.
- Koldras, M., Moczarski, M., 1983. Properties of pike (*Esox lucius* L.) milt and its cryopreservation. Pol. Arch. Hydrobiol., 30 (1): 69 - 78.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., 1975. Plodnost štiky obecné (*Esox lucius*) z rybničního chovu. Živoč. Výroba, 20 (11): 841 - 849.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., 1977. Roční pohlavní cyklus štiky obecné (*Esox lucius* L.) chované v rybnících. Bulletin VÚRH Vodňany, 13(1): 8 - 6.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Svobodová, Z., 1976. Exteriérové a kondiční ukazatele štiky obecné (*Esox lucius* L.) z rybničního chovu a v předvýtěrovém období. Bulletin VÚRH Vodňany, 12(3): 3 - 8.
- Szabó, T., 2001. Hormonally induced ovulation of Northern pike via sustained-release vehicles. N. Am. J. Aquacult., 63: 137-143.
- Szabó, T., 2003. Ovulation induction in Northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. Aquac. Res., 34: 479 - 486.
- Szabó, T., 2008. Use of Carbopol resin for carp pituitary administration improves the fertilization percentage of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus) eggs in commercial hatcheries. Hydrobiologia, 601: 91 - 97.
- Švinger, V. W., Bondarenko, V., Kallert, D. M., Policar, T., 2012. Vliv dvou metod hypofyzace na kvalitu jiker u štiky obecné (*Esox lucius*). Bulletin VÚRH Vodňany, 49: 21 - 33.

Rozsah grafických prací: dle potřeby (do 20 stran)
Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury: viz příloha

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: **Ing. Jiří Křišťan, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání diplomové práce: **11. prosince 2016**
Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2018**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 11. prosince 2016

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	13
2.1 Biologie	13
2.1.1 Systematické zařazení.....	13
2.1.2 Rozšíření a výskyt	14
2.1.3 Popis těla.....	15
2.1.4 Význam.....	16
2.1.5 Růst a potrava.....	17
2.2 Reprodukční charakteristiky	18
2.3 Přirozený výtěr.....	19
2.4 Řízená reprodukce.....	21
2.4.1 Generační ryby a hormonální stimulace	21
2.4.2 Získávání ovulovaných oocytů.....	22
2.4.3 Charakteristika získaných oocytů a jejich kvalita	23
2.4.4 Odběr spermatu	25
2.4.5 Kvalita spermatu a jeho charakteristiky.....	26
2.4.6 Oplození a zbavení lepivosti jiker	29
2.4.7 Inkubace jiker	30
3. MATERIÁL A METODIKA	33
3.1 Generační ryby.....	33
3.2 Biometrické ukazatele	35
3.3 Hormonální ošetření.....	36
3.4 Odběr spermatu	37
3.4.1 Odběr vytlačovaného spermatu.....	37
3.4.2 Odběr spermatu pomocí katetru	38

3.4.3 Odběr testikulárního spermatu	40
3.5 Stanovení kvality spermatu.....	40
3.5.1 CASA analýza spermatu	40
3.5.2 Koncentrace spermií a plodnost mlíčáků	41
3.5.3 Plodnost jikernaček.....	43
3.5.4 Osmolalita semenné plazmy	44
3.6 Oplozovací test.....	45
3.6.1 Generační ryby	45
3.6.2 Oplození jiker a jejich nasazení na inkubaci.....	45
3.7 Statistické vyhodnocení a porovnání dat	48
4. VÝSLEDKY	50
4.1 Absolutní a relativní plodnost generačních ryb	50
4.1.1 Plodnost mlíčáků	50
4.1.2 Plodnost jikernaček.....	52
4.2 Kvalita odebraných spermií - CASA analýza	53
4.2.1 Motilita - pohyblivost	53
4.2.2 VCL - Curvilinear velocity	55
4.2.3 VAP - average path velocity	57
4.2.4 VSL - straight-line velocity.....	60
4.2.5 LIN - linearity.....	61
4.2.6 WOB - wobble	63
4.2.7 BCF - Beat cross frequency	65
4.3 Osmolalita semenné plazmy	66
4.4 Anatomie močopohlavních cest	67
4.5 Oplozenost jiker	69
4.5 Líhnivost larev	70
5. DISKUSE	71

5.1 Plodnost generačních ryb.....	71
5.2 Pohyblivost	72
5.3 Rychlost pohybu spermií- velocity	74
5.4 Linearita, Zvlnění pohybu spermií a frekvence úderů spermií.....	75
5.5 Osmolalita:.....	76
5.6 Oplozovací test.....	77
6. ZÁVĚR.....	80
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	81
8. ABSTRAKT	89
9. ABSTRACT	90

1. ÚVOD

Štika obecná (*Esox lucius*, Linneaus, 1758) je z hospodářského hlediska velice zajímavým druhem ryby, který lze nalézt v mnoha různých sladkovodních biotopech severní polokoule (Crossman, 1996). Zájem u této ryby budí hlavně její velice rozšířený výskyt, který je dán zejména vysokou adaptabilitou tohoto rybího druhu na různé vodní prostředí. Dalším důvodem, proč se zajímat o štika je fakt, že štika produkuje velice kvalitní, dietní a snadno stravitelnou svalovinu, která je oblíbená mezi konzumenty ryb. V neposlední řadě je také štika oblíbená mezi sportovními rybáři, kteří ji vyhledávají kvůli její bojovnosti, vytrvalosti, agresivitě (Lusk a Krčál, 1982), ale i díky její velikosti, kdy může dorůst až 30 kg.

Ve vodním ekosystému pak štika působí jako typický predátor, který se živý převážně rybami (Crossman, 1996; Zalachwski, 2000) a ovlivňuje tak kvantitu i kvalitu populací ostatních druhů ryb. Velkou část potravy štiky totiž tvoří nemocné a slabé ryby (Paukert a kol., 2003). Této schopnosti je využíváno jak v rybníkářských extenzivních chovech, tak i ve vodárenských nádržích, kde pozitivně potlačuje rozvoj hospodářsky nevýznamných druhů ryb. Potlačením nevýznamných druhů dává štika v rybníčním chovu možnost lepšího využití potravy a zvýšení přírůstku hospodářsky nejvýznamnějšímu druhu, kapru obecnému (*Cyprinus carpio*; Adámek a kol., 2010). Zhodnocením biomasy nevýznamných druhů ryb pak zvyšuje svůj přírůstek, a tak zajišťuje produkci významného doplňkového druhu ryby (Dubský 1998).

V Evropě se štika chová jen jako doplňkový druh, který se ve volných vodách vyskytuje pouze v nízkých hustotách od 1 do 4 kg.ha⁻¹ (Hartman a Regenda, 2014) a rybníčních chovech od 0,7 do 176 kg.ha⁻¹ (Kratochvíl, 2012). Produkce štiky v Evropě je velmi proměnlivá a nedostatečná (Policar, 2012a). Hlavním důvodem nedostačující a nevyrovnané produkce je nedokonale zvládnutá umělá reprodukce, neefektivní inkubace jiker a odchov larev a juvenilů do stádia rychleného plůdku (Craig, 2008). Nízká produkce je způsobena zejména vysokým predáčním tlakem a velkou mírou kanibalismu mezi štikami (Lusk a Krčál, 1982). Dalším důvodem nízké produkce je i samotná biologie štik, zejména pak dlouhé období výtěru hormonálně neošetřených generačních ryb (Policar, 2012a). Dále pak jen malá

produkce spermatu, které je navíc při odběru kontaminováno močí. Tato kontaminace způsobuje omezenou použitelnost spermatu při umělém výtěru (Hulák a kol., 2008a). V neposlední řadě je problém i proměnlivá kvalita jiker a náchylnost oplozených jiker a embryí k nešetrnému zacházení při manipulaci a inkubaci. Všechny tyto faktory negativně ovlivňují oplozenost jiker a snižují produkci štiky (Berka a Hamáčková, 1980; Hampel, 2015). Ve volných vodách je úbytek štik spojován zejména s narušováním přírodních podmínek, hlavně pak absence zatopeného litorálního pásma a s tím spojená nemožnost přirozené reprodukce. Dalším důvodem je i s vysoký rybářský tlak (Falkowski a Wolos, 2007). Tyto aspekty jsou důvodem nedostatečné nabídky štičího masa na trhu a vysoké ceny (Policar, 2012a).

Navýšení produkce štiky intenzivním chovem v recirkulačních systémech s krměním suchými granulovanými směsmi není doposud příliš zvládnuté. Důvodem je hlavně vysoký podíl kanibalismu, který se projevuje u ryb od velikosti TL = 30 mm (Policar, 2012b; Szczepkowski, 2009). Kanibalismus u juvenilních štik lze snížit nebo i zastavit kontinuálním podáváním suché granulované směsi (Kucska a kol., 2005).

Cílem této diplomové práce je přispět k optimalizaci managementu výtěru generačních ryb štiky obecné s cílem produkovat dostatečné množství kvalitních pohlavních buněk. Především u mlíčáků byl testován způsob odběru spermatu pomocí speciálního katetru s cílem eliminovat kontaminaci spermatu močí. Při odběru spermatu katetrem a bez něj (sperma bylo získáváno klasickým vytlačěním) bylo sledováno odebírané množství a následně hodnocena a porovnána kvalita spermií u ryb předem hormonálně ošetřených kapří hypofýzou. Vzorčky čerstvého spermatu odebraného katetrem či bez něj byly využity k analýzám kvality spermatu a následně k oplození vzorků získaných jiker. U vzorků oplozených jiker byl poté sledován vliv různě odebraného spermatu na oplozenost jiker, líhivost a kvalitu larev.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Biologie

2.1.1 Systematické zařazení

třída: Ryby (*Osteichthyes*)

Původně se jednalo o čistě sladkovodní čelistnatce, kteří se dnes vyskytují ve všech typech vod včetně vod slaných i brakických. Vyznačují se torpédovitým nebo doutníkovitým tvarem těla, avšak vyskytují se zde i výjimky jako například úhořovitý, diskovitý, z boků zploštělý a dorzoventrálně zploštělý tvar. Na těle se nachází postranní čára (Baruš a Oliva, 1995).

podtřída: Paprskoploutví (*Actinopterygii*)

Jedná se o skupinu ryb s typicky vyztuženými ploutvemi kostěnými paprsky (Baruš a Oliva, 1995).

nadřád: Kostnatí (*Teleostei*)

Skupina vyznačující se osifikovanou kostrou, v ploutvích se nacházejí jak tvrdé nerozvětvené paprsky tak i rozvětvené měkké paprsky (Baruš a Oliva, 1995).

řád: Štikotvární (*Esociformes*)

Skupina paprskoploutvých ryb obsahující jen dvě čeledi *Umbridae* a *Esocidae* (Baruš a Oliva, 1995).

čeleď: Štikoví (*Esocidae*)

Charakteristický rys je protažený a zploštělý rypec. Na čelistech, hlavně pak na spodní, se nacházejí spolu s drobnými zuby i zuby zvětšené, takzvané zuby psí, které jsou typické například pro candáta. Ocasní ploutev je vykrojená a na těle chybí tuková ploutvička. Ploutev hřbetní společně s ploutví řitní jsou posunuty do zadní části těla. V žaludku se nenacházejí pylorické přívěsky a plynový měchýř je se střevem spojen kanálkem. Čeleď obsahuje jediný rod *Esox* s 5 druhy (Baruš a Oliva, 1995).

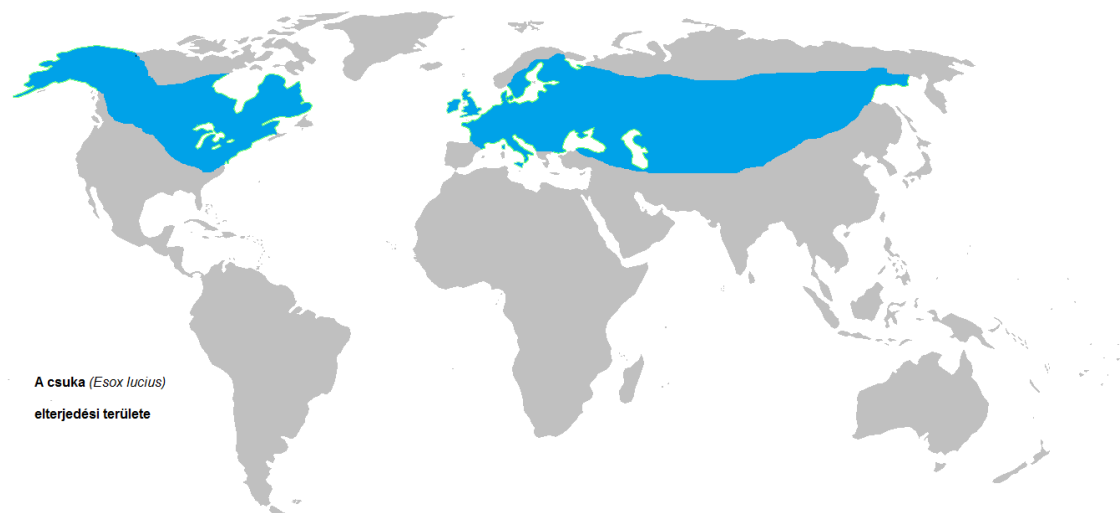
rod: Štika (*Esox*)

Rod je charakterizovaný stejně jako čeleď a zahrnuje 5 druhů. Prvním druhem je štika americká (*Esox americanus*), další pak štika amurská (*Esox reichertii*), štika muskalunga (*Esox masquinongy*), štika obecná (*Esox lucius*) a štika řetízková (*Esox niger*). Na území České republiky se vyskytuje pouze jediný druh a to štika obecná (*Esox lucius*, L.; Baruš a Oliva, 1995; Crossman, 1996).

2.1.2 Rozšíření a výskyt

Štika obecná je cirkumpolárně rozšířena mezi 40 až 75° severní šířky (Obr. č. 1). Vyskytuje se jak v Severní Americe, kde žije od severu Aljašky až na jih k řece Mississippi na východ ke Skalistým horám a na západ k Alleganskému pohoří. V Kanadě štika obývá oblast od Labradoru až po zátoku Mugaba, Quebec, Ontario, řeku Sv. Vavřince, Manitobu, Saskatchewan, Albertu a Britskou Kolumbii (Baruš a Oliva., 1995).

V Evropě se štika vyskytuje od ostrovů Velké Británie přes Francii k Itálii. Na severu v Pobaltských státech. Na jihu až k Černému moři. Na Východě k řekám Ural, Volha, Kura a Amu-darja a k jezeru Bajkal, Balchaš až k Čukotskému poloostrovu (Baruš a kol., 1995; Mann, 1996). V Řecku a na Pyrenejském poloostrově se štika původně nevyskytovala, byla tam vysazena a žije zde bez možnosti přirozené reprodukce. Důvodem, proč zde nedochází k přirozené reprodukci je krátká a teplá zima, díky které nedojde u štik k dozrání pohlavních buněk (Calderon, 1955).



Obr. č. 1 - Výskyt štiky obecné (*Esox lucius*) ve světě

Štiky dokáží obývat vody s různou salinitou, z tohoto důvodu je lze nalézt jak ve sladkých, tak i v brakických vodách. Brakické vody obývají štiky hlavně v Baltském moři (Craig, 2008). Salinita v těchto vodách dosahuje hodnot 8-12 ppt, hodnoty salinity na úrovni 20 ppt jsou spojovány s úhyny štik v Dánsku (Jakobsen a kol., 2007).

V ČR lze výskyt štiky pozorovat ve všech rybích pásmech. V pstruhových revírech je přítomnost štiky nežádoucí, neboť je predátorem i lososovitých ryb a díky tomu dochází na těchto revírech k velkým ztrátám zejména pstruhů. Štika je ryba silně teritoriální a vyhledává vody s členitým dnem, s množstvím překážek jako jsou stromy, keře, balvany a ponořené vegetace, u kterých si zakládá své stanoviště a vytyčuje si zde své teritorium, které si brání (Baruš a Oliva, 1995). Kyslíkové nároky nejsou u štiky příliš vysoké a z toho důvodu snáší i více eutrofizované vody s nižším obsahem kyslíku kolem 2 - 4 mg.l⁻¹ (Dubský a kol., 2003). Ve volných vodách se štika díky své teritoriálnosti vyskytuje jen ve velmi nízké početnosti, biomasa zřídka překračuje hodnoty 2,5 kg.ha⁻¹ (Baruš a Oliva, 1995; Holčík, 1970).

2.1.3 Popis těla

Štika má tělo válcovitě protáhlé, z boku mírně zploštělé. Hlava je z přední části zploštělá. Řitní a hřbetní ploutve jsou postaveny nad sebou, prsní ploutve má

štika umístěné nízko a těsně za hlavou. Postavení ploutví štice dodávají nezaměnitelný tvar (Baruš a Oliva., 1995). Tluma štiky je velká, široká s velkým počtem zubů. Zuby jsou přítomny na dolní čelisti, mezičelistech, radličné kosti, patrových kostech a na jazylkové kosti (Dubský a kol., 2003). Protože je štika typický denní lovec a svou potravu vyhledává především zrakem, má velké oči, které jsou umístěné uprostřed hlavy. Tělo pokrývají drobné oválné cykloidní šupiny, které místy vyrůstají ze škáry na některých místech hlavy. Postranní čára je místy přerušovaná, tvořena krátkými segmenty, které probíhají po celé délce těla. Díky postranní čáře dokáže i slepá štika úspěšně lovit potravu (Dvořák, 2014).

Tělo štik bývá velice proměnlivě zbarvené. Na zbarvení štiky se podílí zejména prostředí, ve kterém se štika vyskytuje, ale záleží i na stáří ryby, kondici a zdravotním stavu ryby. Zbarvení hřbetu je tmavě zelené, boky má světlejší se žlutými skvrnami přecházejícími až do pruhů. Břicho je bílé. Ploutve párové jsou žlutobílé s načervenalým nádechem. Ploutve nepárové jsou tmavší s tmavými skvrnami (Baruš a Oliva., 1995).

2.1.4 Význam

Díky své přizpůsobivosti a hojnému rozšíření se štika řadí mezi hospodářsky ceněný rybí druh. Dalším důvodem, proč je štika takto ceněná, je fakt, že produkuje kvalitní, dietní a lehce stravitelnou svalovinu (Lusk a Krčál, 1982). Maso štiky obsahuje jen malé množství tuku (Policar, 2012a) a obsah kalorií ve 100 g masa je jen 89 kcal, oproti například kapru, kde 100 g masa obsahuje 125 kcal (Craig, 2008).

Důležitou roli hraje štika v rybniční akvakultuře, kde se jakožto vrcholový predátor využívá k regulování počtu hospodářsky nevýznamných druhů ryb, jako jsou například karas stříbřitý (*Carrasius gibelio*), plotice obecná (*Rutilus rutilus*), cejnek malý (*Blicca bjoerkna*), střevlička východní (*Pseudorasbora parva*) a další. Díky snížení počtu těchto ryb dochází k zvýšení produkce kapra obecného (*Cyprinus carpio*), jakožto hospodářsky nejvýznamnějšího druhu ryby v ČR (Dubský, 1998). Štika se díky svým vlastnostem využívá i k biomanipulacím na vodárenských nádržích, kde díky predáčnímu tlaku potlačuje výskyt planktonofágních druhů ryb.

Snížení množství planktonofágních ryb má za následek nárůst množství filtrujícího zooplanktonu, zejména rodu *Daphnia* a *Cyclopoida*, který filtrací snižuje množství fytoplanktonu a tak dochází k zvýšení kvality vody (Adámek a kol., 2010).

Produkce štiky do tržní velikosti v Evropě je rozdělena na 2 způsoby. Prvním způsobem je odlov štik z volných vod, hlavně pak z velkých jezer a řek. Nejvýznamnějšími a největšími producenty jsou zejména Rusko s produkcí od 8 000 do 16 000 tun a Finsko s produkcí 6 500 - 8 300 tun. V České republice tvoří roční produkce štik odlovem 140 - 180 tun. Velký podíl na odlovu mají zejména sportovní rybáři, kteří v letech 2008 - 2010 odlovili 120 - 170 tun (Ženíšková a Gall, 2011). Druhým způsobem je tradiční produkce štiky extenzivním chovem v rybnících. Produkce touto metodou pak dosahuje v celé Evropě pouze 220 - 850 tun štiky, což odpovídá 3 - 10 % produkce z odlovu. Nejvýznamnějšími producenty z chovu jsou pak zejména Rusko s produkcí až 280 tun, Polsko s produkcí až 170 tun (FAO, 2013).

Největším producentem štik v ČR je Rybářství Třeboň a.s., které v roce 2011 vyprodukovalo 22 tun tržních ryb. Dalšími producenty jsou například Rybářství Kardašova Řečice s.r.o. s produkcí 8,1 tuny a Rybářství Hluboká s.r.o. s produkcí 4,8 tuny (Bondarenko a kol., 2014). Štiky se v polykulturních obsádkách chovají ve 2 - 4 letých produkčních cyklech (Hamáčková, 1987). Biomasa štik z polykulturních obsádek se pohybuje mezi 0,7 kg.ha⁻¹ a 16 kg.ha⁻¹ (Kratochvíl, 2012). Nízká biomasa je ovlivněna hlavně vysokým predačním tlakem štiky na rybí populaci a také vysokým podílem kanibalismu mezi štikami (Lusk a Krčál, 1982).

2.1.5 Růst a potrava

Štika obecná je typický predátor vodního ekosystému, jejíž potrava se v dospělosti skládá zejména z drobnějších druhů ryb. Vylíhnuté larvy štiky začínají přijímat první exogenní výživu ještě před úplným strávením žloutkového vaku a to při celkové délce těla od 11 mm. První potravou vylíhnutých larev štik je zejména zooplankton ve formě vířníků (*Rotifera*), dafnií (*Daphnia*) a buchanek (*Cyclopoida*). Plůdek štiky o velikosti 20 - 40 mm zkonzumuje denně až 400 nauplií buchanek, tato hodnota odpovídá až 40 % hmotnosti ryby. Se zvětšující se velikostí

štiky (50 - 100 mm) se zvětšuje i lovená potrava a v potravním sperktu převládají larvy a dospělci vodního hmyzu spolu s plůdkem ostatních druhů ryb (Baruš a Oliva, 1995), v hojné míře pak hlavně plůdek okouna říčního (*Perca fluviatilis*; Vodtrádovský, 1971).

Štika patří mezi velmi rychle rostoucí druhy ryb. Jedním z důvodů rychlého růstu je i její pověstná žravost a agresivita (Lusk a kol., 1992). Největších přírůstků dosahuje štika hlavně v prvním roce života, kdy v závislosti na množství potravy dorůstá 160 - 250 mm. V ideálních podmínkách s dostatkem potravy, vhodnou teplotou a dostatkem kyslíku může štika v prvním roce dorůst i 400 mm (Hartman a Regenda, 2014). Na 1 kilogram přírůstku štika musí přijmout 4 - 6 kilogramů potravních ryb (Fortunatová, 1961). V nádrži Lipno dosahovala roční spotřeba potravy štik z 1 ha v průměru 28 - 42 kg (Baruš a Oliva, 1995).

Jedná se o rybu středního věku, která se běžně dožívá 3 - 5 let, zřídka se štika může dožít 8 - 10 let, jsou ale známé i případy kdy byli ulovené nebo nalezené kusy se stářím i 25 let a váhy až 30 kilogramů. Jikernačky se zpravidla dožívají vyššího věku než mlíčáci (Baruš a Oliva, 1995).

2.2 Reprodukční charakteristiky

Pohlavní orgány jsou u obou pohlaví párové a jsou zavěšené na podbřišnicových řasách v dutině břišní podél zevního okraje ledvin (Kouřil a kol., 1976). K pohlavní dospělosti dochází u mlíčáků již během prvního nebo druhého roku života (Billard 1996, Hartman a Regenda, 2014). Sperma je bílé barvy, zpočátku výtěrové sezony hustší konzistence, později pak řidne. Sperma mlíčáci mohou během výtěrové sezony uvolňovat postupně, tudíž je možné vytírat je během výtěrové sezony i opakovaně (Baruš a Oliva, 1995). Charakteristickou vlastností štiky je velmi malá produkce spermatu, pohybující se v rozmezí 0,1 - 1,2 ml. Během ročního cyklu vývoje gonád začínají varlata samců intenzivně růst na konci léta (Linhart, 1984).

U jikernaček nastupuje pohlavní dospělost později než u mlíčáků, nejčastěji během druhého a třetího roku života (Billard, 1996; Hartman a Regenda, 2014). Před obdobím výtěru se vaječníky zbarvují do žluto-oranžové barvy, která charakterizuje

finální stádium zralosti oocytů. Intenzivní vývoj oocytů probíhá ve studené vodě během zimy a počátkem nástupu jara. Bez dostatečně dlouhé studené zimní fáze nedojde u štik k dozrání pohlavních buněk (Calderon, 1955). Gonado somatický index (GSI) u jikernaček dosahuje během letních měsíců v průměru 1 - 2 % hmotnosti gonád ku tělesné hmotnosti, na podzim se GSI zvyšuje na 5 %, v zimě narůstá na 10 - 12 % a na jaře před výtěrem dosahuje GSI až 20 % (Billard, 1996).

Absolutní plodnost jikernaček je ovlivněna jak biotickými, tak i abiotickými faktory. Z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících plodnost jikernaček dominují hlavně velikost a stáří dané ryby. Dále pak plodnost závisí i na lokalitě, kde se daná ryba vyskytuje (Kouřil a Hamáčková, 1975; Hubenova a Zaikov, 2007). Absolutní plodnost jikernaček se pohybuje v rozmezí od 10 000 do 248 000 kusů jiker na jednu rybu (Hochmann, 1964; Billard, 1996; Křišťan a kol., 2013).

Jikry štiky jsou světle žluté barvy o průměrné velikosti 1,5 - 2 mm. Po styku s vodou dojde k nabobtnání jiker a zvětšují svou velikost na 2,5 - 3 mm. Po aktivaci, kontaktu s vodou případně močí nebo krví, dochází u jiker k uzavření mikropyle již během 30 - 60 sekund a po 3 - 4 minutách se jikry stávají lepivými. Lepivost jiker zajišťuje v přirozených podmínkách přilnutí k rostlinnému podkladu a tak se zamezí zapadnutí jiker do substrátu nebo odnesení jiker proudem (Baruš a Oliva, 1995; Randák, 2013). Inkubace jiker trvá v průměru 120 - 130 °D, kdy například při teplotě 12 - 13 °C se štiky začnou kulit po 10 dnech a při teplotě 10 °C se štiky začnou kulit po 12 - 13 dnech.

Pohlavní dimorfismus není během výtěrového období mezi generačními rybami příliš patrný. Jikernačky mají zpravidla před výtěrem zvětšenou břišní partii a močopohlavní papila je vějířovitá a intenzivně prokrvená. Mlíčáky lze odlišit na základě užší a nevýrazné močopohlavní papily s méně výrazným zakulacením břišní partie (Polícar, 2012a).

2.3 Přirozený výtěr

Výtěr štik probíhá v přirozených podmínkách během jara, nejčastěji pak v měsíci březnu a začátkem měsíce dubna. Výtěr štik probíhá jedno rázově. Teplota vody v tomto období dosahuje 7 - 10° C. Štiky v tomto období mohou migrovat proti

proudu až do pstruhových úseků vodního toku. Znamé jsou i případy, kdy výtěr probíhal při nízkých teplotách od 1,5° C (Baruš a Oliva, 1995; Hartman a Regenda, 2014).

Vzhledem k tomu, že se jedná o typicky fytofilní rybu, tedy rybu jejíž výtěr je vázán především na rostliny, vyhledává štika úseky s ponořenou makrovegetací, hlavně pak jemnolistá vodní makrofyta nebo zatopené části luk. Lepivost jiker zajistí přilnutí na rostlinném substrátu (Bondarenko a kol., 2014). Během jarních záplav štiky vyhledávají i zatopené části luk a břehů porostlých rostlinami (Dyk, 1946).

Během přirozeného výtěru lze pozorovat v rámci populace 3 různé preference hloubky vody či substrátu k výtěru, kdy první část populace se vytírá v litorálním pásmu brakických vod. Druhá část vyhledává zatopenou makrovegetaci ve sladké vodě a třetí část populace se vytírá až v 6 metrech hlubokých částech vod (Farrell a kol., 2006).

Hlavní překážkou při přirozeném výtěru štik je nedostatek zarostlého litorálního pásma. Důvodem absence těchto zarostlých litorálních ploch je hlavně lidská činnost spojená s budováním kamených a betonových regulací na tocích. Na údolních nádržích je neúspěch výtěru způsoben také častým kolísáním hladiny vody (Baruš a Oliva, 1995). Výtěrová sezona končí při teplotách trvale dosahujících 14° C (Lusk a Krčál, 1982). Na trdlišti se ryby shlukují během slunečných dní, kdy dochází k intenzivnějšímu prohřívání vody a tak dochází i finálnímu dozrání pohlavních produktů. Před výtěrem se jako první v okolí trdliště začínají shlukovat mlíčáci. Na trdlišti pak často doprovází jikernačku i skupina mlíčáků, později se však na trdlišť dostávají i další samice a poměr mezi pohlavími se vyrovnává. Samotný výtěr může na dané lokalitě probíhat i 2 - 3 týdny. Průběh výtěru bývá velice bouřlivý a může trvat i několik hodin (Baruš a Oliva, 1995; Dubský a kol., 2003). V nepříznivých podmínkách dochází u jikernaček k resorbci jiker, což může mít za následek snížení plodnosti v následujících letech a v určitých případech může dojít i k úhynu ryby (Čítek a kol., 1998).

2.4 Řízená reprodukce

2.4.1 Generační ryby a hormonální stimulace

Generační ryby připravené k umělému výtěru, bývají nejčastěji od podzimu chované ve vhodných komorových rybnících až do nástupu jara. Komorové rybníky jsou dosazeny dostatečným množstvím potravních ryb, kdy se doporučuje se zajistit alespoň 1 - 5 kg potravních ryb na 1 kg štik. Na jaře se zvyšující se teplotou vody na 4 - 6 °C a přibližujícím se výtěrovém období je nutné ryby slovit (Dubský, 1998). Slovené generační ryby se následně doporučuje přesunout do mělčích příkopových rybníčků v blízkosti líhně, nebo je přesunout na odchovné žlaby přímo na líhni. Tímto opatřením je možné snáze řídit teplotu vody a tak i ovlivnit finální dozrávání gamet a tím i termín výtěru (Policar, 2012a). V případě nevyužití hormonální stimulace ryb, je možné generační štiky vysadit do příkopových rybníčků nebo sádek, u kterých předem došlo k dostatečnému zarůstu vegetací. V těchto rybníčcích dochází obdobně jako u vaků k rychlejšímu prohřívání vody. Generační ryby se do těchto rybníků nasazují odděleně dle pohlaví spolu s potravní rybou. U tohoto způsobu přechování štik je nezbytně nutné během ranních a večerních hodin kontrolovat zejména aktivitu a chování generačních jikernaček a kontrolovat teplotu vody. Ohřívání vody během dne způsobuje u ryb zvýšení jejich aktivity, kdy se ryby začínají pohybovat v okolí břehového pásma. Toto chování určuje připravenost generačních ryb k výtěru. Při pozorování této zvýšené aktivity je za potřeby ovulující ryby slovit a přistoupit k umělému výtěru (Policar, 2012a).

Vzhledem k nerovnoměrnému dozrávání pohlavních produktů u jednotlivých jikernaček je při umělém výtěru dobré využít hormonální stimulaci s cílem synchronizovat finální dozrávání gamet a průběh vlastního výtěru (Policar, 2012a; Švinger a kol., 2012). Nejpoužívanějším způsobem hormonální stimulace je hypofyzace. Při hypofyzaci je použita dehydrogenovaná kapří hypofýza v dávce 3 - 4 mg.kg⁻¹ (Policar 2012a; Bondarenko a kol., 2014; Bondarenko a kol., 2015a). Na rozdíl od jiných druhů ryb, kdy je možné použít i syntetické GnRHa nebo kombinaci GnRHa s dopaminergními inhibitory, se u štiky tato hormonální stimulace nedoporučuje z důvodů jejího úplného selhání nebo nesrovnatelné efektivity úspěšnosti oproti kapří hypofýze. Z tohoto důvodu je nejpoužívanější a zároveň i nejefektivnější metodou k synchronizaci dozrávání a ovulace oocytů použití

dehydrogenované kapří hypofýzy (Bondarenko a kol., 2015a; Szabo, 2003). Doba latence, tedy doba od podání hormonálního přípravku do vlastní ovulace oocytů, je u kapří hypofýzy při použití 3 - 4 mg.kg⁻¹ v průměru 96 h (Policar 2012a; Švinger a kol, 2012; Bondarenko a kol, 2014).

U mlíčáků je rovněž možné použití hypofyzace a to v dávce 2 mg.kg⁻¹ (Bondarenko a kol., 2015a). Hormonálně ošetřovat mlíčáky se doporučuje zejména tehdy, pokud je v plánu získávat vytlačované sperma, což je především spojené s umělým výtěrem a oplozením jiker (Policar, 2012a; Švinger a kol., 2012). Takto ošetřené ryby poskytnou větší objem spermatu, neboť použitím hormonálního přípravku dochází ke zvýšené produkci spermií ve varlatech. V případě, že není hormonální stimulace provedena, je velké riziko, že mlíčáci poskytnou jen malý objem spermatu (0,5 - 2 ml) a takto malé množství spermatu může způsobit problémy při umělém oplozování získaných jiker (Hulák a kol., 2008a). V případě využití testikulárního spermatu, tedy spermatu získaného usmrcením ryby a vypreparováním a rozrušením varlat, není hormonální stimulace mlíčáků nutná, ale v rybářské praxi se doporučuje (Policar, 2012a). Doba latence, tedy doba od podání hormonálního přípravku do ovulace, je při použití dané dávky kapří hypofýzy v rozmezí 96 - 98 h (Policar, 2012a; Švinger a kol., 2012).

2.4.2 Získávání ovulovaných oocytů

Nejpoužívanější metodou získávání oocytů je masáž břišní dutiny s následným vytlačováním zralých a ovulovaných oocytů. Během této metody však může dojít stejně jako u lososovitých ryb vlivem mechanického poškození k prasknutí přezrálých jiker a následnému snížení pH ovariální plazmy. Díky této skutečnosti dochází ke snížené oplozenosti jike (Cejko a kol., 2016; Dietrich a kol., 2007).

Další možností použitelnou pro získání zralých oocytů je použití pneumatické metody, která byla prvně použita v Austrálii v roce 1957 (Zurbuch, 1965). Tato metoda je využívána nejčastěji při výtěru lososovitých a jeseterovitých ryb a je založena na injekční aplikaci plynů, nejčastěji vzduchu, dusíku nebo kyslíku do tělní dutiny ryby a díky vzniklému tlaku dojde k vypuzení oocytů z těla ryby ven.

Díky této metodě nedochází k mechanickému porušení jiker vlivem nevhodného zacházení a je i časově méně náročná než klasická masáž břišní dutiny. Pneumatická metoda je co se týče množství odebraných jiker téměř stejně efektivní, jako běžná metoda masáže břišní dutiny. Výhodou pneumatické metody je lepší kvalita získaných ovulovaných jiker (Cejko a kol., 2016).

Absolutní pracovní plodnost u jikernaček vykazuje značné rozdíly v závislosti na velikosti a stáří ryby ale i na lokalitě, kde se daná ryba vyskytuje (Kouřil a Hamáčková, 1975; Kouřil a kol., 1976; Hubenova a Zaikov, 2007). Absolutní plodnost narůstá i se zvyšující se hmotností a délkou jikernačky (Billard, 1996). Křišťan a kol. (2013) uvádí absolutní plodnost jikernaček v rozmezí od 65 000 do 141 000 kusů jiker. Billard (1996) uvádí absolutní plodnost u ryb ve velikosti 325 až 1000 mm od 6000 do 232 000 kusů jiker a Hochmann 1964 udává absolutní plodnost u ryb od 300 do 850 mm od 10000 do 248000 kusů jiker.

Relativní plodnost, tedy množství jiker na kilogram živé hmotnosti ryby, udává Křišťan a kol. (2013) v rozmezí 20 857 až 31 887 ks.kg⁻¹. Baruš a Oliva(1995) udávají relativní plodnost od 19712 do 49901 kusů jiker. kg⁻¹. V jednom gramu jiker se pak nachází 96 až 155 kusů neoplozených jiker (Křišťan a kol. 2013). Jeden litr pak obsahuje přibližně 150000 kusů jiker (Lahnstaier a kol., 1998). Hmotnost jedné jikry se pohybuje v rozmezí 6,1 do 6,4 mg (Bondarenko a kol., 2014).

2.4.3 Charakteristika získaných oocytů a jejich kvalita

Kvalitu získaných jiker lze posoudit na základě pH ovariální plazmy, kdy nízké pH způsobuje nižší oplozenost jiker a líhnivost larev (Wojtczak a kol. 2007). Ke snížení pH ovariální plazmy může dojít při průniku kyselého obsahu přezrálých jiker do méně kyselého prostředí ovariální plazmy. Přezrávání jiker spojené s degradací jikerných obalů a mechanickým poškozením jiker jsou hlavní příčiny snížení pH ovariální plazmy (Dietrich a kol., 2007). Nejvyšší oplozenost na úrovni až 90 % byla pozorována u pH ovariální plazmy 8,35, zatímco nejnižší oplozenost 66% byla pozorována při pH 8,1 (Bondarenko a kol., 2014).

Aby jikry v těle jikernaček nepřezrávaly, je důležité včas identifikovat dobu jejich ovulace a včas přistupovat k umělému výtěru, tedy vytlačení jiker z těla

jikernaček. Během umělého výtěru doporučuje Bondarenko a kol. (2012) nepoužívat k umělému osemenění jiker, následně k inkubaci embryí a produkci larev první a poslední část získaných jiker a to z důvodu, že se v těchto částech vyskytují jikry nízké kvality. Jikry nízké kvality snižují míru oplozenosti jiker a následně líhivost larev, což negativně zhoršuje podmínky inkubace jiker (HAMPL, 2015).

Stárnutí jiker se vztahuje k časové periodě mezi ovulací a oplozením. Během této doby jsou jikry uchovány v těle ryby (*in vivo* uchování jiker) nebo jsou uchovány vně (*in vitro* uchování jiker). V rybě jsou zralé jikry během ovulace uvolňovány z folikulů do vejcovodů nebo do tělní dutiny (lososovití), kde zůstávají dokud nedojde k přirozené stimulaci výtěru vlivem prostředí nebo k vytlačení jiker masáží břišní dutiny při umělém výtěru. Během ovulace jsou jikry v metafázi druhé fáze meiozy (Bobe a Labbe, 2010). Během této poovulační periody jsou jikry v ovariální tekutině. Zpožděný přirozený výtěr nebo výtěr umělý včetně zpožděného oplození může vést k nadměrnému stárnutí a přezrání jiker. Během stárnutí a přezrání jiker dochází k morfologickým, fyziologickým, biochemickým, histologickým, buněčným a molekulárním změnám uvnitř jikry a ovariální tekutiny (Aegerter a kol., 2005; Lahnsteiner a kol. 2000). Tyto změny negativně ovlivňují schopnost oplození a správný larvální vývoj (Lahnsteiner a kol., 2000). Samarin a kol. (2015) testovali vliv stáří jiker uchovávaných *in vivo* a *in vitro* na schopnost oplození a následnou líhivost, kvalitu a ploidní úroveň larev. U *in vivo* uchovávaných jiker odebírali od ovulujících jikernaček každé 2 dny vzorky jiker (2, 4, 6 a 8 dní po ovulaci) a oplozovali je. Nejvyšší míru oplozenosti (70 - 74 %) a líhivosti (67 - 70,7 %) pozorovali u jiker oplozených 4 a 2 dny po ovulaci. Jikry oplozené ihned (0 dní) po ovulaci a jikry oplozené 6 dní po ovulaci vykazovaly oplozenost od 50 do 63 % a líhivost od 40 do 60 %. Nejnižší oplozenost (3 %) i líhivost (2 %) byla zaznamenána u jiker oplozených 8 dní po ovulaci. Množství malformací na larvách narůstalo téměř lineárně se stářím jiker od 2,5 % pro skupinu oplozenou 0 dní od ovulace do 43 % u skupiny oplozené 8 dní od ovulace. Larvy skupiny 0, 2 a 4 byly 100% diploidní, u skupiny 6 a 8 byla zaznamenána triploidie na úrovni 7% . U skupiny *in vitro* uchovávaných jiker probíhalo oplozování po 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 a 96 hodinách od ovulace. Nejvyšší oplozenost (68 %) a líhivost (63 %) zaznamenal u skupiny oplozené ihned (0 h) po ovulaci. Po 24

hodinách klesala oplozenost i líhivost pod 50 %. Se stářím jiker narůstala i úmrtnost a množství malformací u larev až na 33 %.

2.4.4 Odběr spermatu

Sperma štik může být získáno několika způsoby. Prvním způsobem je odběr testikulárního spermatu, tedy spermatu odebraného z vypreparovaných varlat z usmrcené ryby (Billard, 1996; Hulák a kol., 2008a). Po vyjmutí varlat je důležité jejich osušení, očištění od krve a následné rozrušení, aby bylo možné sperma přecedit přes jemný uhelon nebo nylonovou punčochu. Sperma se přes uhelon aplikuje přímo na ovulované jikry (Dubský, 1998). Výhoda této metody spočívá v získání většího množství spermatu s vyšší koncentrací spermií, které při správném způsobu odběru není kontaminované močí a ani krví. Správně odebrané sperma je možné uchovávat po dobu 24 - 48 hodin při teplotě 2 - 4°C. Možné poškození spermií, zejména pak jejich bičků vlivem mechanického protlačování skrze uhelon, může působit při umělém výtěru problémy s oplozeností (Rodina a kol., 2008). Usmrcení ryby a nemožnost jejího znovu využití k dalšímu výtěru je hlavní nevýhodou této metody (Hulák a kol., 2008a,b).

Druhým používaným způsobem získání spermatu je odběr spermatu pomocí palpce břišní dutiny, kdy se sperma uvolňuje z chámovodů (Billard a Cosson, 1992; Dubský 1998). Při této metodě je sperma buďto přímo aplikováno na odebrané ovulované jikry a dochází k osemenění, nebo je sperma odebíráno do připravené stříkačky a použito následně (Hulák a kol., 2008a). Nevýhodou takto získávaného spermatu je jeho variabilní kvalita, která bývá snížena zejména příměsí moči nebo krve. Takto kontaminované sperma je předčasně aktivováno, a tím je omezena i jeho následná použitelnost při umělém osemenění. Nespornou výhodou této metody je zachování živé ryby pro další výtěr (Hulák a kol., 2008a,b). Ke kontaminaci spermatu močí a následnému snížení jeho kvality dochází i u dalších hospodářsky významných druhů ryb, jako je sumec velký (*Silurus glanis*; Linhart a kol., 2004), lín obecný (*Tinca tinca*; Linhart a kol., 2003; Rodina a kol., 2004), kapr obecný (*Cyprinus carpio*; Poupard a kol., 1998), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*; Glogowski a kol., 2000).

Kontaminaci spermatu močí lze u některých ryb předejít použitím katetru z Pasteurovy kapilárové pipety. Mlíčák se při této metodě položí na bok a do urogenitální papily se mu zavede katetr, kterým se nejprve vypustí moč a následně odebere sperma (Berka a Hamáčková, 1980). Touto metodou lze však odebrat jen omezené množství spermatu, které může limitovat úspěšnost umělého oplození jiker (Linhart, 1984; Billard, 1996).

Odebrané sperma je možné i dlouhodobě uchovávat pomocí kryoprezervace. Ovšem takto lze uchovávat jen kvalitně odebrané sperma bez kontaminujících příměsí. Hluboce zamražené sperma může být bez problému použito k oplození i po delší době. Při kryoprezervaci štičího spermatu je možné použít několik způsobů, lišících se v použití kryoprotektantu a odlišného množství mražených spermií (Ciereszko a kol., 2008; Nynsa a kol., 2012; Ciereszko a kol., 2013). K následnému úspěšnému oplození jiker je nutno použít vysokou koncentraci spermií od $4 \cdot 10^5$ (Zhang a kol., 2011) do $3 \cdot 10^6$ (Babiak a kol., 1998). Úspěšně lze použít hluboce zamražené sperma s využitím glukozo-metanolového kryoprezervativa. Úspěšnost oplození jiker u zamraženého spermatu může být téměř totožná s úspěšností oplození čerstvým spermatem (Deitrich a kol. 2016, Zhang a kol., 2011).

2.4.5 Kvalita spermatu a jeho charakteristiky

Spermie většiny kostnatých druhů ryb včetně spermie štiky, se skládají z hlavičky bez akrozomu, střední části a pohyblivé části bičíku, který má typické cylindrické uspořádání skládající se z $9 + 2$ mikrotubulů. Bičík spermie lze dále rozdělit na proximální, centrální a koncovou část. Spermie štiky má na bičíku takzvanou periferní třáseň (Alavi a kol., 2009). Hlavička obsahuje nukleus, a tedy i otcovskou genetickou informaci s haploidní sadou chromozomů. energii pro svůj pohyb získává spermie z mitochondrií, uložených ve střední části. Pohybem bičíku pak generuje pohyb (Lahnsteiner a Patzner, 2008). Rybí spermie se ve varlatech vyskytují v nepohyblivém stavu. Po uvolnění spermií z varlat do vnějšího prostředí během výtěru, dochází k jejich aktivaci a spermie musí během velice krátké doby dosáhnout vajíčka (jikry). K pohybu ji pak slouží právě bičík, který je poháněn

energií z ATP, ADP a CrP (Dzyuba a kol., 2017). Hlavními faktory ovlivňující motilitu spermií jsou teplota, pH, koncentrace iontů a osmolalita (Alavi a kol., 2007). Porozuměním těmto faktorům lze zlepšit metody umělého výtěru a zvýšit efektivitu krátkodobého a dlouhodobého uchování spermatu (Linhart a kol., 2003). Během přirozené reprodukce se spermie stávají pohyblivými po přechodu do vnějšího prostředí vlivem nízké koncentrace K^+ a hypo-osmotického šoku. Díky těmto vnějším faktorům se spouští řetězec biochemických reakcí, které vedou k pohybu bičíku a tak i k pohybu samotné spermie (Alavi a kol., 2007).

V před výtěrovém období se koncentrace spermií ve varlatech pohybuje v rozmezí $2,4 - 4,1 \cdot 10^{10}$ spermií na 1 gram varlat. Celkem se pak produkce spermií u jednoho mlíčka může pohybovat v rozmezí $4,4 - 7,9 \cdot 10^{11}$ na 1 kilogram živé hmotnosti mlíčka (Billard, 1983). K uvolňování spermatu u pohlavně zralých mlíčáků dochází již od měsíce listopadu do května. Během listopadu uvolňuje sperma okolo 15 % samců. V lednu a v únoru se množství samců uvolňujících sperma zvyšuje na 25 - 30 %. Od výtěrové sezony, tedy od měsíce března do dubna uvolňuje sperma více než 60 % samců (Billard, 1996). Plodnost mlíčáků ovlivňuje jejich velikost a stáří, ale i období, kdy je sperma odebráno. Zpočátku výtěrové sezóny produkují mlíčáci pouze 0,3 - 0,4 ml na kilogram živé hmotnosti. Postupně se objem spermatu zvyšuje až na $1,35 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ke konci výtěrové sezóny produkce spermatu zase klesá (Billard, 1996). Od jednoho mlíčka lze v průměru odebrat od 0,5 do 2,5 ml spermatu (Linhart, 1984; Hulák a kol., 2008a,b).

Velikost spermií udává (Alavi a kol. 2009) v průměru od 31,38 - 34,49 μm . Průměrná hustota spermií se během výtěrového období pohybuje okolo $22,26 \cdot 10^9$ v 1 ml spermatu. Minimální množství spermií je pak okolo $2,5 \cdot 10^9$ a maximální množství $68 \cdot 10^9$ spermií v 1 ml (Linhart, 1984; Hulák a kol., 2008a).

Nejdůležitějším ukazatelem kvality spermatu je rychlost pohybu a motilita spermií, která zajišťuje spermii dosáhnout vajíčka a zajistit tak jeho oplození (Holwill, 1971). Analýza pohyblivosti spermií probíhá za pomoci počítačového videozáznamu spojeného s CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), který zaznamenává stopy vytvořené pohybem hlavičky spermií, ale i jejich rychlost. Mezi nejpozorovanější parametry kvality spermatu pomocí CASA analýzy patří pohyblivost neboli motilita spermií v %. VCL - curvilinear velocity (křivočará rychlost), VSL - straight line velocity (lineární rychlost), VAP - average path

velocity (úhlová rychlost), LIN - linearity (přímočarost), BCF - beat cross frequency (frekvence úderů) a další (Boryshpolets a kol, 2013). Podrobné informace o pohybu spermii lze získat z analýz parametrů pohybu bičíku, které jsou zaznamenány pomocí mikroskopu s vysokým rozlišením a vysokorychlostním videozáznamem (Cosson a kol., 2008). Mezi pozorované charakteristiky bičíku spermii patří délka vln, vlnové rozpětí, rychlost vlnění, zakřivení bičíku, počet ohybů podél bičíku, amplituda výkyvu a další (Bondarenko a kol. 2014). Pohyblivost spermii je ovlivňována několika vnějšími faktory jako jsou, pH, teplota, koncentrace iontů a osmolalita, osmotický tlak (Alavi a kol., 2007; Cosson a kol., 1999; Alavi a kol., 2005). Spermie štiky mají po aktivaci jen velice krátkou dobu pohyblivosti s maximální dobou pohybu 90 s ve sladké vodě při teplotě 4°C (Hulák a kol., 2008a; Hulák a kol., 2008b; Linhart a kol., 1984). Průměrnou rychlost spermii udává Bondarenko a kol (2014) okolo 160 $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$. Hulák a kol. (2008b) udává průměrnou rychlost spermii na úrovni 120 - 180 $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$ v době 15 sekund po aktivaci spermii. S postupujícím časem spermie velmi rychle ztrácí energii a zpomalují rychlost na hodnotu 20 -100 $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$. Spermie aktivované močí se dokáží pohybovat až 3 minuty.

Osmolalita spermatu testikulárně odebraného dosahuje průměrné hodnoty 300 - 350 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, zatímco osmolalita spermatu vytlačovaného dosahuje průměrných hodnot 273 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$. U močí dosahuje osmolalita průměrných hodnot 68 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Hulák a kol, 2008b).

Koncentrace iontů vytlačovaného spermatu pak dosahuje průměrných hodnot pro Na^+ 116 mM, pro Cl^- 116 mM, pro K^+ 25 mM a pro Ca^{2+} 1mM (Alavi a kol., 2009). Koncentrace iontů testikulárně odebraného spermatu dosahuje průměrných hodnot pro Na^+ 123mM, pro Cl^- 127 mM a pro K^+ 35 mM (Hulák a kol., 2008b). Z rozdílů mezi osmolalitami mezi testikulárně odebraným spermatem a spermatem vytlačovaným, lze odhadnout, že u snížené osmolality vytlačovaného spermatu dochází ke snížení osmolality semenné plazmy kontaminací močí.

Největší procento pohyblivých spermii a nejvyšší rychlost spermii je pozorována u osmolality mezi 125 a 235 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$. V prostředí s osmolalitou vyšší než 375 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ dochází k inhibici motility spermii. K nejvyšším procentuelním hodnotám pohyblivých spermii dochází během prvních 10 sekund po jejich aktivaci v prostředí s osmolalitou 125 - 235 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Alavi a kol., 2009). Krátce po aktivaci spermii v destilované vodě (velmi nízká osmolalita),

dochází k tvorbě puchýřků na membráně podél bičíku, které zamezují správnému a efektivnímu pohybu bičíku. Po 30 sekundách od aktivace dochází k zakřivení bičíku a k tvorbě smyčky na jeho zadní části, tím se snižuje jeho délka a pohyb bičíku je vytvářen jen v proximální části blízko hlavičky. Tímto se snižuje efektivita pohybu spermie (Alavi a kol., 2009).

2.4.6 Oplození a zbavení lepivosti jiker

Oplozenost jiker může být negativně ovlivněna mnoha faktory, které mohou způsobit vysokou mortalitu jiker a embryí v průběhu inkubace. Mezi hlavní faktory ovlivňující oplozenost patří období výtěru, způsob hormonální stimulace generačních ryb, stáří ryb, manipulace s jikrami a pH ovariální plazmy. Všechny tyto faktory ovlivňují především kvalitu jiker, a tak i následnou oplozenost. Míra oplozenosti je dále ovlivněna způsobem oplození jiker. Samotné oplození jiker probíhá optimálně okamžitě po odběru spermatu. Na 1 kg jiker se aplikuje přibližně 3 - 4 ml spermatu odebraného alespoň od 3 mlíčáků (Bondarenko a kol., 2014; Hampl, 2015). Použití zmíněného objemu spermatu zajistí dobrou míru oplozenosti jiker (67%) a v případě kvalitní inkubace i vysokou líhivosti larev (65%). Vysoká oplozenost jiker a líhivost larev je u štiky především zajištěna optimálním množstvím 400 - 500 000 spermií na 1 jikru. Oboje gamety musejí být vysoké kvality (Křišťan a kol., 2013). Oplozenost jiker u ryb stimulovaných dehydrogenovanou kapří hypofýzou se pohybuje od 40 do 63 % a líhivost larev je při této metodě přibližně o 7 - 10 % nižší než oplozenost jiker, jestliže je inkubace provedena v optimálních podmínkách. U hormonálně neošetřených generačních ryb se líhivost larev během začátku výtěrového období pohybuje mezi 52 % a 69 %. Líhivost na úrovni 12 % - 40 % se vyskytuje u ryb ke konci výtěrového období (Policar, 2012a).

K aktivaci spermií dojde po přidání optimálně 0,5 l aktivačního roztoku na 1 kg jiker (Bondarenko a kol., 2014). Nejpoužívanějším aktivačním roztokem je voda z líhně nebo 7 % roztok soli s vodou (Berka a Hamáčková, 1980; Alavi a kol., 2009). Díky použití solného roztoku se vlivem osmotického šoku, způsobeného roztokem, prodlužuje doba, po kterou může být jikra oplozena (Cejko a kol., 2016). Dalším možným aktivačním roztokem může být použit i Woyarovichův roztok nebo

Billardův roztok. Woynarovichův roztok obsahuje 68 mM NaCl a 50 mM moči, jeho pH je 7,7 a osmolalita 180 mOsmol.kg⁻¹. Billardův roztok pak obsahuje 125 mM NaCl, 20 mM Trisu, 30 mM glycinu a 1 mM CaCl₂, pH roztoku je 9 a osmolalita je 350 mOsmol.kg⁻¹. Oplozovací roztok s obsahem 5,52 g NaCl, 3,75 g glycinu a 2,42 g Trisu se při umělém osetení nedoporučuje z důvodu vyššího výskytu vývojových vad (až 19 %) na vykultovaných larvách, jako je skolióza nebo syndrom malých očních bodů (Hampl, 2015).

Po 5 - 10 minutách se aktivované jikry nechávají odlepkovat. Zbavení lepivosti jiker je při umělém výtěru nezbytným krokem, který zajistí, že se jikry nevytvoří shluky, které jsou háklivé na napadání plísněmi a negativně ovlivňují přežití jiker a následnou líhivost. K odlepkování jiker lze použít plnotučné mléko (3,5 % tuku), jíl, vodný roztok talku a soli (100 g talku s 20 - 25 g NaCl v 1 l vody). Nejčastěji se používají 2 díly odlepkovacího roztoku na 1 díl jiker. Samotné odlepkování jiker trvá v závislosti na použitém přípravku od 30 - 90 minut (Bondarenko a kol., 2014).

2.4.7 Inkubace jiker

Po odlepkování je třeba jikry důkladně propláchnout a přesunout k inkubaci na Chaseovy láhve nebo upravené Zugské láhve. Zugské láhve jsou upraveny pomocí děrovaného trychtýře na dně láhve a tak dojde ke zpomalení proudu vody. Přežívání zárodků při inkubaci je dáno především způsobem inkubace jiker (Policar, 2012a; Švinger a kol., 2012). Nižší průtok vody je velice důležitý pro úspěšnou inkubaci, neboť při vyšším průtoku může dojít zvýšeným pohybem jiker k jejich porušení vlivem nárazů o stěny aparátu a o sebe navzájem a následnému úhynu (Policar, 2012b; Bondarenko a kol., 2014). Během prvních 40 °D inkubace je dobré se vyvarovat manipulaci s jikrami, neboť při manipulaci v rané fázi vývoje zárodku dochází k navyšování ztrát až o 25 % (Bondarenko a kol., 2013; Hampl, 2015). Hampl (2015) testoval vliv manipulace s jikrami na jejich přežití a uvádí nejnižší přežití embryí ($33,33 \pm 16,05 - 49,7 \pm 8,7$ %) při manipulaci s jikrami během prvních 12 hodin od oplození. Při manipulaci s jikrami od 12 h po oplození do 6 dnů

od oplození uvádí přežití embryí od $55,67 \pm 4,99$ do $62,33 \pm 2,49$ %). Přežití $61,67 \pm 4,19$ pozoroval u embryí bez manipulace.

V Chaseových láhvích o objemu 5 litrů se doporučuje nastavit průtok vody v rozmezí 3 - 6 l.min⁻¹. U Zugských lahví o objemu 10 litrů se doporučuje průtok 4 - 8 l.min⁻¹ s nasazením 2 litrů jiker. (Bondarenko a kol., 2014). K inkubaci jiker štiky je vhodné použít mechanicky předčištěnou vodu bez hrubších nečistot a kvalitou odpovídající vodě používanou při inkubaci jiker u lososovitých ryb (Billard, 1996; Hochleither, 2004).

Pro správný vývoj embrya a jeho životaschopnost je velice důležitým faktorem teplota vody. Teplota vody nám dále ovlivňuje i rychlost vývoje a dobu inkubace embryí (Bohlen, 2003; Drozd a kol., 2009; Kupren a kol., 2011). Celková doba inkubace štiky je v průměru 110 - 140 °D. Optimální vývoj jiker a nejvyšší líhivost nastává při inkubaci za teploty 6 - 10 °C (Bondarenko a kol., 2014; 2015b). Inkubace při vyšších teplotách urychluje vývoj jiker, ale dochází ke zhoršení kvality vykultovaných larev (Füllner a kol., 2007). Teplota vody se ke konci inkubace postupně zvyšuje až na 12 - 14°C (Bondarenko a kol., 2014; 2015b).

Při nástupu stádia očních bodů je vhodné aplikovat koupel jiker v 11 - 13 % solném roztoku, díky čemuž dojde k lepšímu oddělení mrtvých a živých jiker (Füllner a kol., 2007; Bondarenko a kol., 2013). Mrtvé jikry se od živých začnou oddělovat a stoupat k hladině po přibližně 60 sekundách. Živé jikry je nutné co nejdříve přesunout zpět do čerstvé vody. Koupelí 5 - 8 dní starých jiker ve 2% roztoku NaCl po dobu 20 minut omezíme výskyt a následné napadení jiker plísněmi zejména rody *Saprolegnia* a *Achyla*. Ve stádiu očních bodů nebo při začátku kulení je vhodné přesadit embrya na ploché líhňářské aparáty nebo na kolébky. Během kulení je potřeba udržovat dobrou kvalitu vody, a to zejména odstraňováním jikerných obalů a uhynulých embryí či larev z aparátů. Kulení probíhá v závislosti na teplotě vody a množství kulících enzymů v okolní vodě od několika hodin až po 2 dny. Kulení lze synchronizovat a urychlit přemístěním embryí do igelitového pytle s kyslíkovou atmosférou na 30 - 60 minut na stinné místo, kde díky uzavřenému prostředí dochází k nárůstu koncentrace kulících enzymů (Hartman a Regenda, 2014). Další možností urychlení kulení je náhlé zvýšení teploty o 5 - 7 °C, tímto zákrokem dojde ke snížení obsahu kyslíku ve vodě (Bondarenko a kol., 2013).

Po vylíhnutí se larvy štiky přesunou na kolébky s vhodným substrátem (sítovina, sláma, větve jehličnanů nebo břízy), kde se mohou následně vykulené larvy štiky zavěsit a dokončit vývoj. Čerstvě vylíhnuté larvy štiky měří 8,5 - 9 mm a jejich hmotnost je 10 - 11 mg (Billard, 1996). Vylíhnuté larvy se zavěšují pomocí adhezivní papily na připravený substrát a dokončují vývoj (Policar, 2012b). V přirozených podmínkách zavěšení na substrátu umožňuje larvám vyhnout se dnu s nepříznivými podmínkami, jako je například bahnitý substrát, do kterého mohou zapadnout, nebo nízká koncentrace kyslíků u dna (Craig, 2013). Po uplynutí přibližně 130 °D po vylíhnutí se larvy začínají rozplavávat a naplňují plynový měchýř. Rozplavané larvy s naplněným měchýřem tráví žlutkový váček a přibližně po 150 - 160 °D začínají přijímat první exogenní potravu (Policar, 2012b). Ústa se prořezávají 2 - 4 dny po vylíhnutí a řitní otvor se vytváří 4 - 5 dní od vylíhnutí (Craig, 2013). Po rozplavání většiny larev, kdy se jich zavěšuje již jen 25 - 50%, je vhodné larvy nasadit do dalšího chovu (Policar, 2012b).

3. MATERIÁL A METODIKA

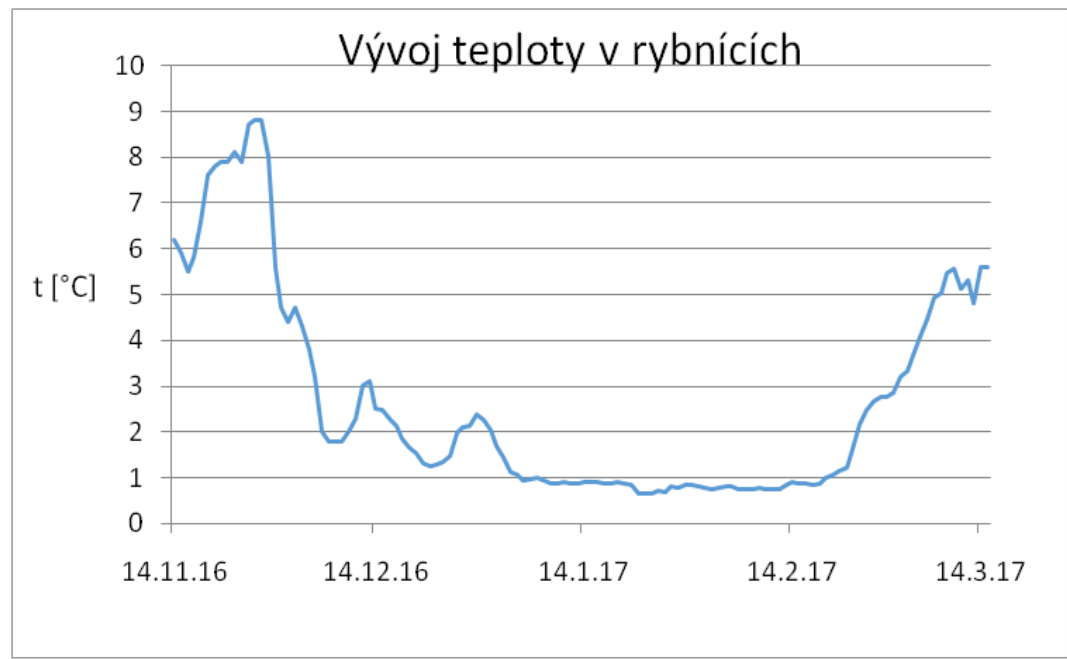
Celý experiment diplomové práce byl realizován v prostorech Experimentálního rybochovného pracoviště a pokusnictví (ERPP) a v laboratřích Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH) Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV) ve Vodňanech. Konkrétně se jednalo o Laboratoř intenzivní akvakultury a Laboratoř fyziologie a reprodukce..

3.1 Generační ryby

Generační štiky byly získány výlovem experimentálního rybníku o rozloze 0,15 ha ERPP FROV JU ve Vodňanech, kam byly štiky přepraveny a vysazeny během podzimních výlovů (dne 15.11.2016) z Rybářství Nové Hrady s.r.o. spolu s potravní rybou (střevlička východní a plotice obecná o TL = 50 – 10 mm) v množství 20 kg na 1 kg nasazených štik. Výlov generačních ryb (Obr. č. 2) proběhnul v ranních hodinách 15. března 2017, kdy byly některé štiky pozorovány v zarostlém litorálu, což svědčilo o jejich zvýšené aktivitě a přípravě k reprodukci. Teplota vody ($1,88 \pm 1,61$ °C) ze zmíněného zimního období před výtěrem generačních ryb znázorňuje Graf č. 1. Složené generační štiky byly rozříděny podle pohlaví. Poznávacím znakem byl tvar urogenitální papily. U mlíčáků byl tvar papily úzký oproti vějířovité papile jikernaček. Dále bylo pohlaví zjišťováno mírným stlačením břišní dutiny a na základě ukázání pohlavních produktů byly ryby rozříděny podle pohlaví. Vyříděné ryby byly následně přesunuty do předem připravených vaků se stabilním přítokem čerstvé okysličené a mírně prohřáté vody. Teplota v tomto období do výtěru ryb se pohybovala na úrovni $7,95 \pm 1,37$ °C. V mělce napuštěných vacích docházelo k rychlejšímu prohřívání vody, a tak i k pozvolnému dozrávání pohlavních produktů. Ryby byly každý den kontrolovány, zda-li nedochází k předčasnému uvolňování jiker.



Obr. č. 2 - Výlov generačních ryb



Graf č.1. Teplota vody v komorovém rybníce

3.2 Biometrické ukazatele

U všech generačních štik byly stanoveny biometrické ukazatele. Mezi sledované parametry patřila celková délka (TL), délka těla (SL) a hmotnost (W). Před každým měřením a vážením ryb došlo k anestezii ryb, podle Bondarenka a kol. (2015b), aby byla zajištěna šetrná a snadná manipulace, a tak bylo zajištěno i přesné měření. Jako anestetikum byl použit přípravek hřebíčkový olej v dávce 0,3 ml v 10 l vody. V anestetiku byly ryby jen po nezbytně dlouhou dobu, která byla potřeba k jejich uspaní. Uspaná ryba se otáčela na bok a nereagovala na vnější podněty (Obr. č. 3). Měření délky probíhalo na pracovní desce s metrem a k vážení byla použita váha T- scale s přesností 5g. Změřené a zvážené ryby byly okamžitě přesunuty do nádrže s čerstvou vodou, kde došlo k bezproblémovému zotavení. Generační ryby byly rozděleny do 3 stejně velkých skupin a jedné skupiny po 5 generačních mlíčáčích. První skupina byla připravena na odběr vytlačovaného spermatu bez použití katetru (B), druhá skupina pro odběr katetrem (K), třetí skupina byla připravena na odběr testikulárního spermatu (T) jako další kontrola. Čtvrtá skupina byla připravena na oplozovací test. Do třech skupin pro odběr spermatu bylo celkem nasazeno 25 ks generačních mlíčáků o $TL = 472,2 \pm 65,993$ mm, $SL = 413,88 \pm 56,771$ mm a $W = 797,4 \pm 282,733$ g. Ve skupině s odběrem spermatu bez katetru (B) bylo použito 10 ks mlíčáků, ve skupině s odběrem spermatu s katetrem (K) bylo využito také 10 ks mlíčáků a ve skupině s odběrem testikulárního spermatu (T) bylo použito 5 mlíčáků. Ve skupinách K a B byli použiti stejně velcí mlíčáci a ve skupině T byli použiti menší mlíčáci, všechny ryby byly stáří 3 let.



Obr. č. 3 - Anestezie generačních ryb

3.3 Hormonální ošetření

Vzhledem k potřebě hromadného dozrání pohlavních buněk u jednotlivých generačních ryb bylo potřeba přistoupit k synchronizaci finálního dozrání a uvolnění gamet použitím hormonální stimulace. Použitým hormonálním přípravkem byla dehydrogenovaná kapří hypofýza. Hormonální stimulace byla aplikována intramuskulárně pod prsní ploutev pomocí injekční stříkačky (Obr. č. 4) s roztokem hormonálního přípravku. Jikernačky byly hypofyzovány dávkou 4 mg.kg^{-1} . U mlíčáků bylo použito 2 mg.kg^{-1} kapří hypofýzy. Celkové množství hypofýzy potřebné k hormonální stimulaci bylo vypočteno na základě hmotnosti všech generačních ryb. Potřebné množství hypofýzy pro jikernačky bylo následně rozpuštěno ve fyziologickém roztoku tak, aby vždy 1 ml fyziologického roztoku obsahoval 4 mg hypofýzy. Díky tomu bylo na 1 kg ryby aplikován 1 ml roztoku, tedy i 4 mg hypofýzy. Dávka hypofýzy pro mlíčáky byla aplikována stejným způsobem, tedy ve formě roztoku 2 mg hypofýzy na 1 ml fyziologického roztoku. Doba latence při použití zmíněné dávky hormonálního přípravku byla stanovena na 96 h. Dle doby

latence byl následně naplánován samotný výtěr generačních ryb. Nejprve byla realizována část experimentu týkající se odběru a hodnocení kvality spermatu a následně až byl realizován oplozovací test.



Obr. č. 4 - Hormonální ošetření ryb kapří hypofýzou

3.4 Odběr spermatu

3.4.1 Odběr vytlačovaného spermatu

Všichni k výtěru připravení mlíčáci, byli postupně zklidněni v anestetiku pomocí roztoku hřebíčkového oleje (stejný postup popsán při stanovení biometrických ukazatelů ryb). Zklidnění jedinci byli postupně používáni k odběru spermií. Nejprve byli položeni na pracovní stůl na vlhký ručník, kde došlo k osušení oblasti močopohlavní papily a řitní ploutve. K finálnímu osušení zmíněných tělních partií byl použit papírový ubrousek, aby nedošlo ke kontaminaci spermatu vodou. Palpací břišní dutiny byla nejprve odebrána moč a následně do nové připravené injekční stříkačky odebíráno vytlačované sperma (Obr. č. 5). Poté byl zaznamenáván

pomocí injekční stříkačky celkový objem odebraného spermatu s přesností na 0,1 ml. Při odběru bylo dbáno zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k odebrání moči, krve nebo výkalů, které by mohly zhoršit kvalitu spermatu jeho předčasnou aktivací. Každá stříkačka s odebraným spermatem byla označena číslem ryby a označením, které prezentovalo vytlačené sperma (K, B, T). Následně byla stříkačka uložena na led. Takto bylo v krátkém časovém intervalu (30 minut) odebráno několik vzorků (2 – 4), které byly ihned transportovány do Laboratoře fyziologie reprodukce VÚRH FROV JU k detailnímu stanovení kvality spermatu.



Obr. č. 5 - Odběr vytlačovaného spermatu

3.4.2 Odběr spermatu pomocí katetru

U zklidněných mlíčáků došlo stejně jako v předchozím případě k osušení močopohlavní papily a oblasti řitní ploutve. Odběr spermatu probíhal zasunutím připraveného katetru napojeného na stříkačku (Obr.č. 6) do vývodu pohlavních cest zhruba do hloubky 10 mm (Obr.č. 7). Při zasunutí bylo nutné dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k zasunutí do střeva, nebo aby nebyla porušena stěna

močopohlavní trubice, a tak nedošlo k poškození mlíčka. Následným mírným stlačením (masáží) břišní dutiny došlo k uvolnění spermatu, které bylo odebíráno do připravené stříkačky. Po ukončeném odběru byl opět zjištěn objem odebraného spermatu s přesností na 0,1 ml. Stříkačka byla opět označena tak, že každý vzorek jasně prezentoval číslo mlíčka a způsob odebrání spermatu katetrem. Stříkačka s odebraným spermatem byla uložena na led a ihned přepravena do Laboratoře fyziologie reprodukce VÚRH FROV JU k detailnímu stanovení kvality spermatu.



Obr. č. 6 - Katetr s odebraným spermatem



Ob. č. 7 - Odběr spermatu katetrem

3.4.3 Odběr testikulárního spermatu

Mlčáci připravení na odběr testikulárního spermatu byli omráčeni úderem do hlavy a následně usmrceni vykrcením po přetnutí žaberních oblouků. Po usmrcení došlo k otevření břišní dutiny a následnému vyjmutí varlat z těla ven. Vypreparovaná varlata byla osušena a očištěna od případné krve. Suchá a čistá varlata byla poté pomocí nůžek rozrušena a pomocí jemného uhelonu s velikostí ok 300 μm bylo sperma přeceděno a odebráno do připravené stříkačky. Takto odebrané sperma bylo použito k detailnímu stanovení kvality v Laboratoři fyziologie reprodukce VÚRH FROV JU.

U jedné z ryb ze skupiny pro odběr testikulárního spermatu došlo k vypreparování celých močopohlavních vývodných cest. Vypreparované močopohlavní cesty byly vyfoceny za pomoci fotoaparátu Canon EOS 1100D. U vypreparovaných cest byla pozorována jejich anatomie. Zasunutím katetru do vypreparované soustavy byla následně vyzkoušena jejich průchodnost a s tím spojená použitelnost katetru.

3.5 Stanovení kvality spermatu

3.5.1 CASA analýza spermatu

Měření kvality spermií probíhalo ihned po odebrání spermatu v Laboratoři fyziologie reprodukce VÚRH FROV JU. Samotné měření parametrů spermií probíhalo za pomoci CASA analýzy a počítačového videozáznamu. Mezi sledované kvalitativní znaky spermatu patřily následující parametry: Motilita - pohyblivost v %, VCL (curvilinear velocity) - křivočará rychlost v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Jedná se o součet postupných pohybových vzdáleností na každém snímku dráhy spermie, který je rozdělený do celého času stopy. VAP (velocity average path) - rychlost úhlové dráhy v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, odvozená dráha založená na průměrném počtu bodů v celém čase stopy. VSL (straight-line velocity) - lineární rychlost v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, jedná se o přímou lineární vzdálenost mezi počátečním a koncovým bodem dráhy spermie v celém čase stopy. LIN (linearity) - linearita nebo přímočarost v %, jedná se o poměr konečné

pohybové vzdálenosti k celkové dráhové vzdálenosti a je ovlivněna symetrií pohybu bičíku. BCF (beat cross frequency) - frekvence úderů v Hz, jedná se o odchylky hlavičky od průměrné dráhy za 1 sekundu. WOB (wobble) - zvlnění pohybu, jedná se o poměr mezi VCL a VAP.

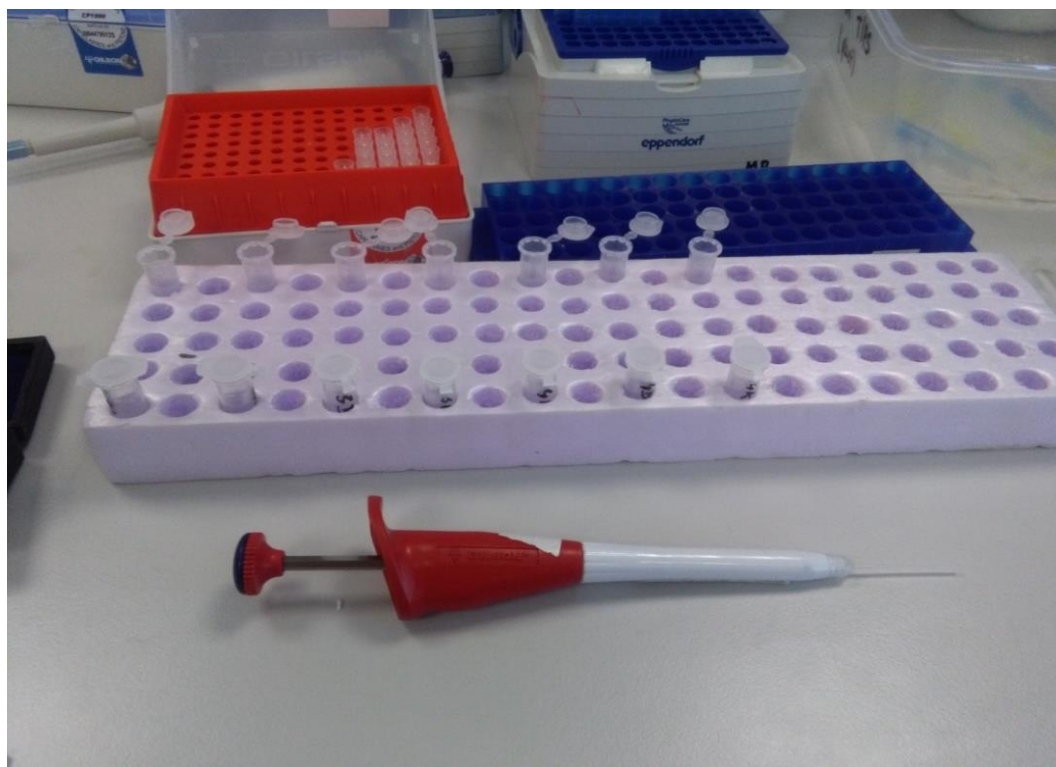
V této diplomové práci bylo k aktivaci spermií použito dvou různých aktivačních roztoků. Prvním aktivačním roztokem byla destilovaná voda s 0,25 % pluronicu, který zabraňuje lepivosti spermií. Druhým použitým aktivačním roztokem byl roztok Trisu ve složení 10mM Tris, 8 pH HCl. Všechny parametry spermatu byly pozorovány a měřeny po dobu 59 sekund od aktivace daným aktivačním médiem.

3.5.2 Koncentrace spermií a plodnost mlíčáků

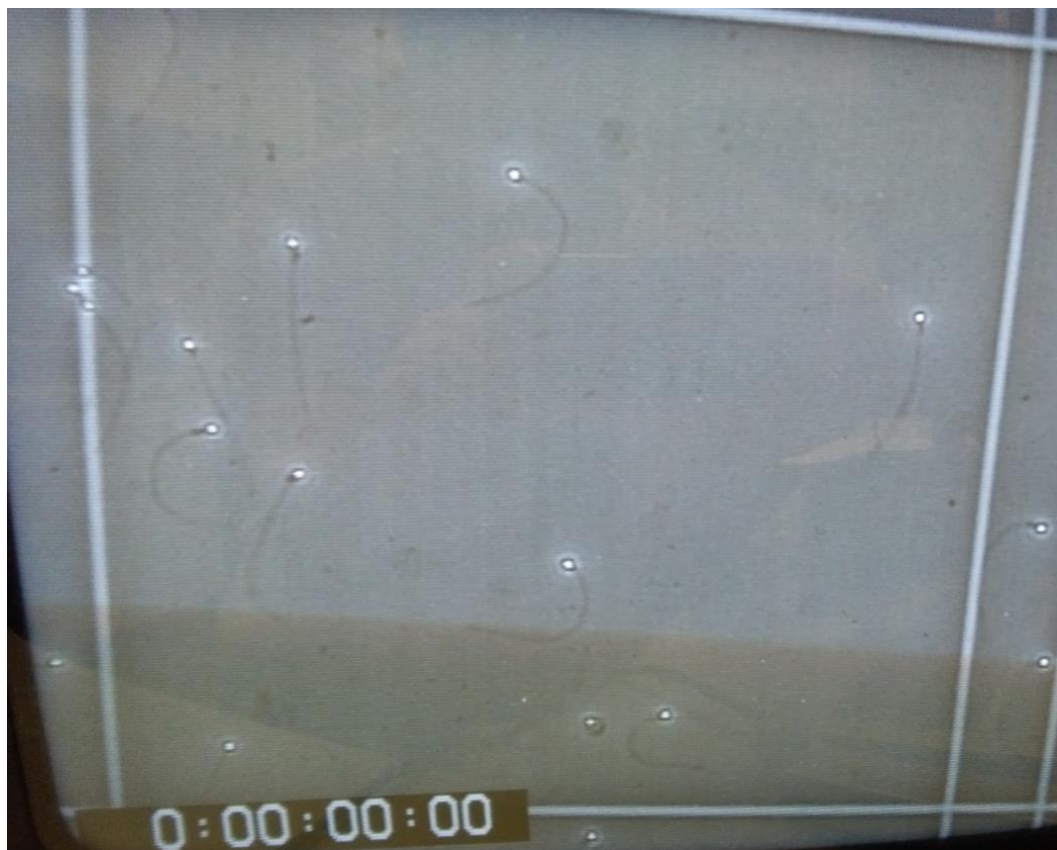
Koncentrace spermií byla stanovena ze stejných odebraných vzorků, ze kterých byly stanoveny kvalitativní parametry CASA analýzou spermií. Před samotným počítáním a výpočtem koncentrace spermií bylo nutné sperma dostatečným způsobem naředit, aby bylo možné počítat jednotlivé buňky - spermie v daném vzorku. Zředění proběhlo tak, že bylo do mikropipety odebráno 10 μ l spermatu a následně smícháno s 990 μ l fyziologického roztoku (Obr. č. 9). Vzniklý roztok byl důkladně promíchán na IKA MS1 mini třepačce při použití 1400 otáček za minutu po dobu 10 sekund. Z tohoto roztoku bylo následně dále odebráno opět 10 μ l spermatu, které bylo smícháno s 990 μ l fyziologického roztoku. Vzniklý roztok byl opět důkladně promíchán na zmíněné mini třepačce. Výsledné ředění bylo tedy 1:10000. K vlastnímu spočítání počtu spermií byla použita Bürkerova komůrka. Kapka z připraveného vzorku byla nanesena na okraj krycího sklíčka pipetou tak, aby kapka sama natekla do komůrky. Komůrka byla následně uložena pod mikroskop Olympus BX41. Pro pozorování počtu spermií bylo použito zvětšení 20 \times , při kterém došlo k spočítání počtu spermií v celkem dvanácti komůrkách. Jednotlivé počty spermií v každé komůrce u každého vzorku a každého mlíčáka byly zaznamenány (Obr.č 10). Ze získaných hodnot byla následně vypočtena konečná koncentrace spermií na 1 ml spermatu každého analyzovaného mlíčáka podle vzorce: průměrný počet spermií v 1 čtverci \times 0,00025 \times 10000. Výsledná koncentrace spermií byla vyjádřena v miliardách na jeden mililitr odebraného spermatu.

Absolutní pracovní plodnost mlíčáků byla vypočtena na základě koncentrace spermií v 1 ml a objemu odebraného spermatu od jednotlivých mlíčáků dané skupiny (K - katetr, B - bez katetru). Z vypočtených absolutních pracovních plodností jednotlivých ryb byla zpočtena průměrná plodnost pro danou skupinu odběru spermatu. Výsledek absolutní pracovní plodnosti je uváděn v $1 \cdot 10^9$ spermií.

Relativní pracovní plodnost byla vypočtena z absolutní plodnosti dané ryby skupiny odběru a její hmotnosti. Konečná hodnota relativní pracovní plodnosti byla spočtena jako průměr a směrodatná odchylka pro danou skupinu odběru. Výsledkem relativní pracovní plodnosti je počet spermií $1 \cdot 10^9 \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti ryby.



Obr.č. 9 - Mikropipeta a připravené vzorky



Obr. č. 10 - Spermie v Burkerově komůrce

3.5.3 Plodnost jikernaček

Absolutní pracovní plodnost jikernaček byla stanovena na základě hmotnosti odebraných jiker a hmotnosti jedné jikry. Hmotnost jedné jikry byla vypočtena na základě množství jiker v 1 g od dané jikernačky. Z hmotnosti jedné jikry a celkové hmotnosti odebraných jiker od dané jikernačky byla spočtena absolutní pracovní plodnost pro danou rybu. Z výsledků absolutní pracovní plodnosti byla následně vypočtena průměrná absolutní pracovní plodnost vyjádřená v kusech jiker.

Relativní pracovní plodnost jikernaček byla zjištěna z absolutní pracovní plodnosti dané ryby a její celkové hmotnosti. Z těchto hodnot byla následně vypočtena průměrná relativní pracovní plodnost vyjádřená v kusech jiker na 1 kg živé hmotnosti ryby.

3.5.4 Osmolalita semenné plazmy

Všechny odebrané vzorky, které byly určeny na stanovení koncentrace spermií a parametrů motility, byly také využity k měření osmolality semenné plazmy. Každý vzorek byl postupně dvakrát odstředěn v centrifúze Thermo Fresco 17. První odstředění probíhalo po dobu 20 minut při teplotě 4°C s rychlostí odstředění 0,3 G. Druhé odstředění probíhalo 20 minut při teplotě 4°C s rychlostí odstředění 3,0 G.

Po konečném odstředění byl vzorek přesunut do čisté Eppendorf zkumavky, a tak byl vzorek připraven k samotnému měření osmolality. Osmolalita byla měřena pomocí přístroje VAPRO Vapor Pressure Osmometer (Obr.č. 11). Potřebné množství vzorku k měření bylo u tohoto přístroje 10 μ l, který byl odebrán mikropipetou. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Osmometr byl po každém vzorku kalibrován dle manuálu. Osmolalita byla měřena v jednotkách mOsmol.kg⁻¹. Konečný výsledek osmolality byl vyjádřen jako průměrná hodnota ze tří zanalyzovaných hodnot \pm S.D.



Obr. č. 11 - měření osmolality

3.6 Oplozovací test

3.6.1 Generační ryby

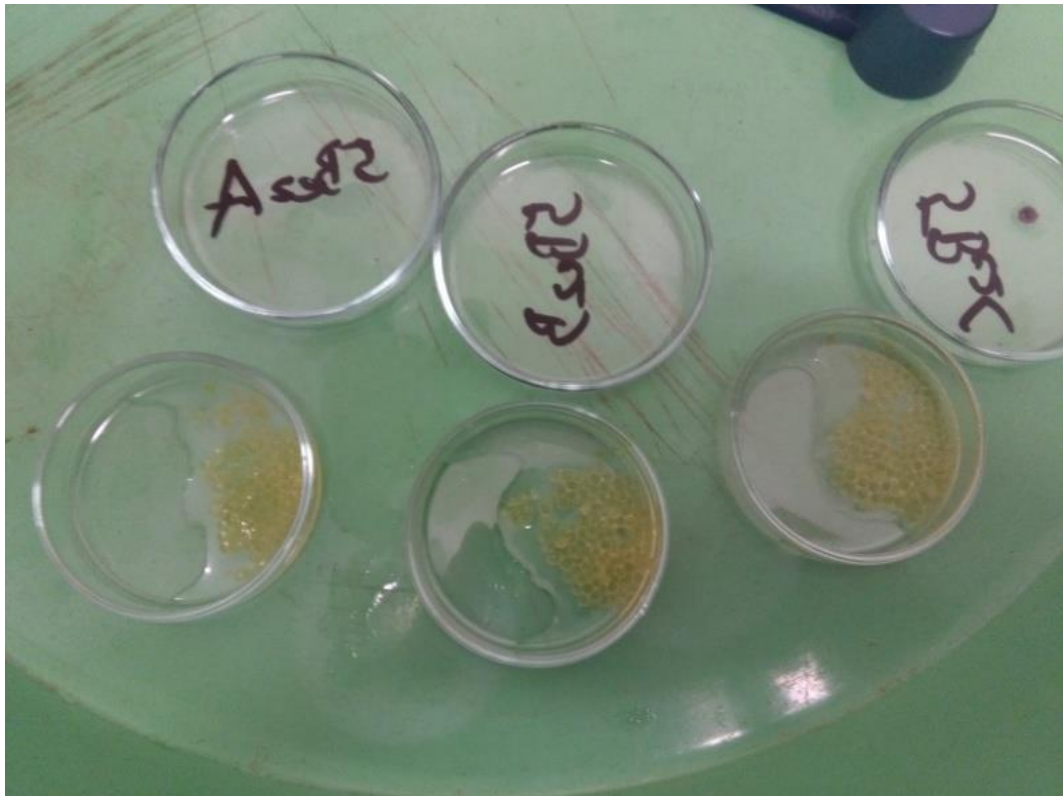
Skupina generačních ryb určených k realizaci oplozovacího testu byla složena z 8 ks jikernaček (TL = 566,8 ± 38,5 mm, SL= 496,8 ± 29,8 mm a W= 1434,6 ± 192,0 g) a 15 ks mlíčáků (TL = 493,1 ± 87,8 mm, SL= 432,6 ± 75,9 mm a W= 927,7 ± 470,6 g), které byly do vlastní realizace testu drženy odděleně při teplotě vody $t_v = 7,95 \pm 1,38$ °C. U mlíčáků došlo ke stejnému hormonálnímu ošetření kapří hypofýzou (2 mg.kg⁻¹), které bylo použité jako u předešlých ryb využitých ke stanovení kvality spermatu. Generační jikernačky k oplozovacímu testu byly hormonálně stimulované kapří hypofýzou o dávce 4 mg. kg⁻¹. Po 96 hodinové latenci došlo k ovulaci jiker u 5 jikernaček, od kterých byly za použití anestézie získávány oocyty. Samotné získávání oocytů bylo prováděno po osušení močopohlavní papily a jejího okolí, aby nedošlo k předčasné aktivaci jiker. Vytlačované oocyty byly odebírány do suché, označené a zvážené misky a následně byla zjištěna jejich hmotnost. Později byla vypočtena konečná pracovní a relativní plodnost, když u každé jikernačky bylo zjištěno kolik kusů oocytů je obsaženo v jednom gramu oocytů. Oocyty byly vytlačovány po stěně misky, aby nedocházelo k zbytečným otřesům, a tak i k jejich snížené kvalitě a s tím spojenými vyššími ztrátami při inkubaci (Bondarenko a kol., 2014; Hampl, 2015). Od každé jikernačky bylo odebráno 10 g neoplozených oocytů, které byly následně smíchány s oocyty dalších jikernaček. Takto vzniklý směsný vzorek oocytů byl použit na oplození a následnou inkubaci jiker s cílem zjistit oplozenost jiker a líhivost larev po oplození jiker spermatem odebraným bez katetru (B), s katetrem (K) nebo od usmrcených mlíčáků (testikulární - T).

3.6.2 Oplození jiker a jejich nasazení na inkubaci

Celkem u 15 mlíčáků došlo k odběru spermatu, kdy u 5 z nich došlo k odběru pomocí katetru, u 5 ks bylo sperma odebráno bez použití katetru a u 5 kusů došlo k odebrání testikulárního spermatu. Odběr spermatu probíhal podle zaběhnuté

metodiky z části práce, kdy se hodnotila kvalita spermatu. Odebrané sperma před použitím na oplozovací test bylo uchováno v chladícím boxu na ledu až do vlastního oplození vzorku jiker. Ze směsného vzorku získaných jiker bylo postupně odebráno 45 podvzorků jiker o jednotné hmotnosti 1 gram. Každý takovýto vzorek byl uložen na 1 Petriho misku o průměru 50 mm. Následně bylo sperma od 5 mlíčáků z dané skupiny (B, K, T) použito na oplození 15 podvzorků jiker uložených na 15 Petriho miskách. Tzn., že každý vzorek jiker na Petriho misce byl oplozen spermatem od jednoho mlíčáka se třemi opakováními.

Oplozované vzorky jiker o hmotnosti 1 gram obsahovaly přibližně 130 kusů jiker. Na oplození tohoto vzorku bylo použito 10 μ l spermatu od určitého mlíčáka a následně byla směs spermií a jiker zalita 1 ml aktivačního média ve formě vody z líhně (Obr. č. 12). Celý vzorek byl následně 60 sekund míchán a poté promyt vodou, aby nedošlo ke slepení jiker. Po propláchnutí byly oplozené jikry přesunuty na experimentální líhňářské aparáty používané Bondarenkem a kol. (2015b). V okamžiku, kdy se jikry vysazovaly na každý aparát, došlo u nich k spočítání exaktního počtu nasazovaných jiker, což bylo důležité pro následné stanovení míry oplozenosti jiker a líhnivosti larev. Na aparáty z akrylového skla o velikosti 230×100×140 mm se spodním přítokem, byly oplozené jikry rovnoměrně rozmístěny po dně na nerezovou síťovinu s velikostí ok 0,3 mm s cílem zamezit jejich slepení a následnému zaplísnění. Každý inkubátor byl vybaven přítokovou hadičkou s regulovatelným přítokem a odtokem vody. Jednotlivé aparáty byly napojeny na dílčí recirkulační systém klimatizované místnosti ERPP FROV JU Vodňany, kde byla konstantně držena teplota vody na úrovni 10°C a obsah rozpuštěného kyslíku na úrovni 100 %.



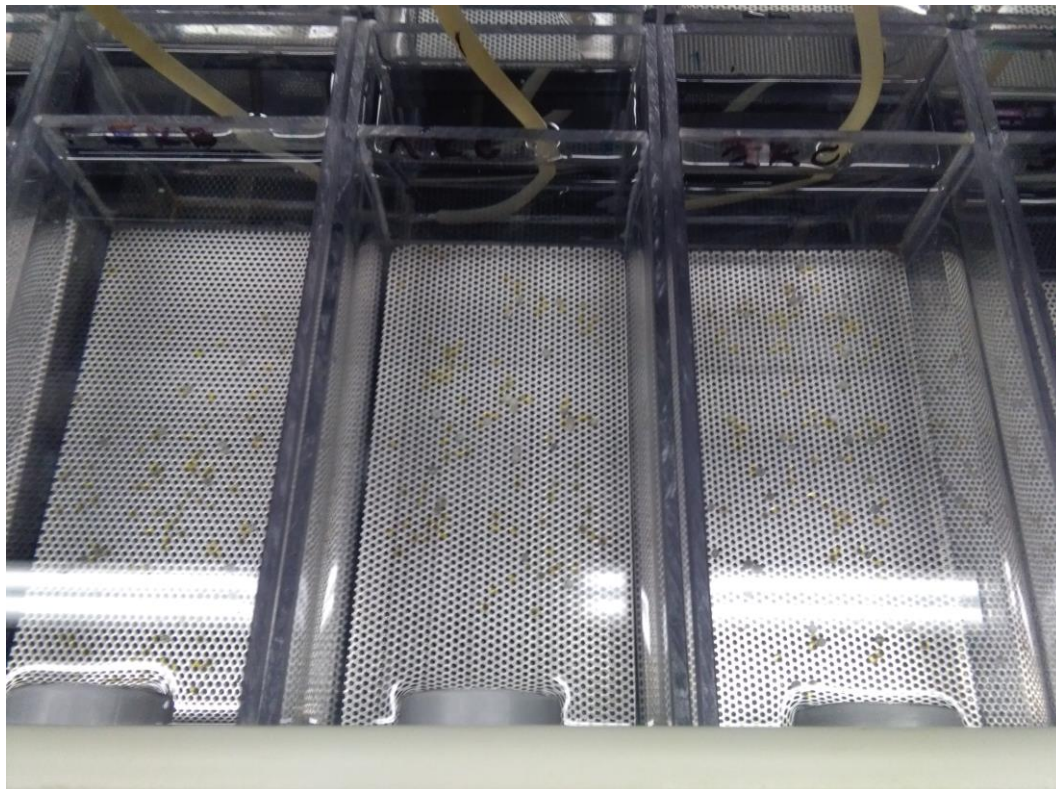
Obr. č. 12 Oplozené a aktivované jikry

Každý aparát byl označen skupinou dle použitého spermatu (K - katetr, B - bez katetru a T - testikulární) a číslem a písmenem vzorku, který odpovídal použitému mlíčákovi (1-5) a opakování (a,b,c).

3.6.3 Stanovení oplozenosti jiker a líhnivosti larev

Oplozenost jiker byla zjišťována po 3. dni inkubace jiker po uplynutí 30 °D. V každém vzorku byl spočítán počet živých (průhledných nebo žlutých jiker se zárodkem; Obr. č.13) a mrtvých jiker (bílých či zakalených jiker). Následně došlo ke stanovení míry oplozenosti jiker (%) tím, že počet živých jiker byl vydělen počtem všech nasazených jiker a výsledek byl vynásoben 100 krát. Na konci 13. dne po oplození, kdy byly vylíhnuté všechny larvy v daném vzorku, došlo k výpočtu líhnivosti larev (%), kdy nejprve byly spočítány všechny vylíhnuté larvy. Tento počet vylíhnutých larev byl vydělen počtem všech nasazených jiker do vzorku. Poté byl tento výsledek vynásoben 100 krát. Oplozenost jiker a líhnivost larev byla u každého mlíčáka a každé varianty odběru spermatu stanovena třikrát. Poté došlo k výpočtu

průměrné hodnoty oplozenosti jiker a líhivosti larev u každého mlíčka potažmo varianty odběru spermatu společně s výpočtem hodnoty směrodatné odchylky.



Obrázek 13. Oplozené a neoplozené jikry

3.7 Statistické vyhodnocení a porovnání dat

Pro potvrzení normálního rozdělení získaných hodnot byl proveden Shapiro-Wilkův test. Po potvrzení předpokladů pro použití parametrického testu byly rozdíly v parametrech (Osmolalita, koncentrace spermií, objem spermatu, plodnost mlíčáků) odhadnuty pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA) a následně Tukeyho post-hoc testem. Všechny analýzy byly provedeny v softwaru "Statistica 13, StatSoft, Inc.". K získání normálního rozdělení hodnot byla data parametrů oplozenosti a líhivosti transformována $\log(x+1)$. K porovnání změn mezi parametry z CASA analýzy (Motilita, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB, BCF) byla použita dvofaktoriální analýza ANOVA. Rozdílná písmena u výsledků značí statisticky významný rozdíl mezi testovanými skupinami daného sledovaného parametru. U všech testů byla

úroveň významnosti nastavena na $p < 0,05$. Všechny výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

4.VÝSLEDKY

4.1 Absolutní a relativní plodnost generačních ryb

4.1.1 Plodnost mlíčáků

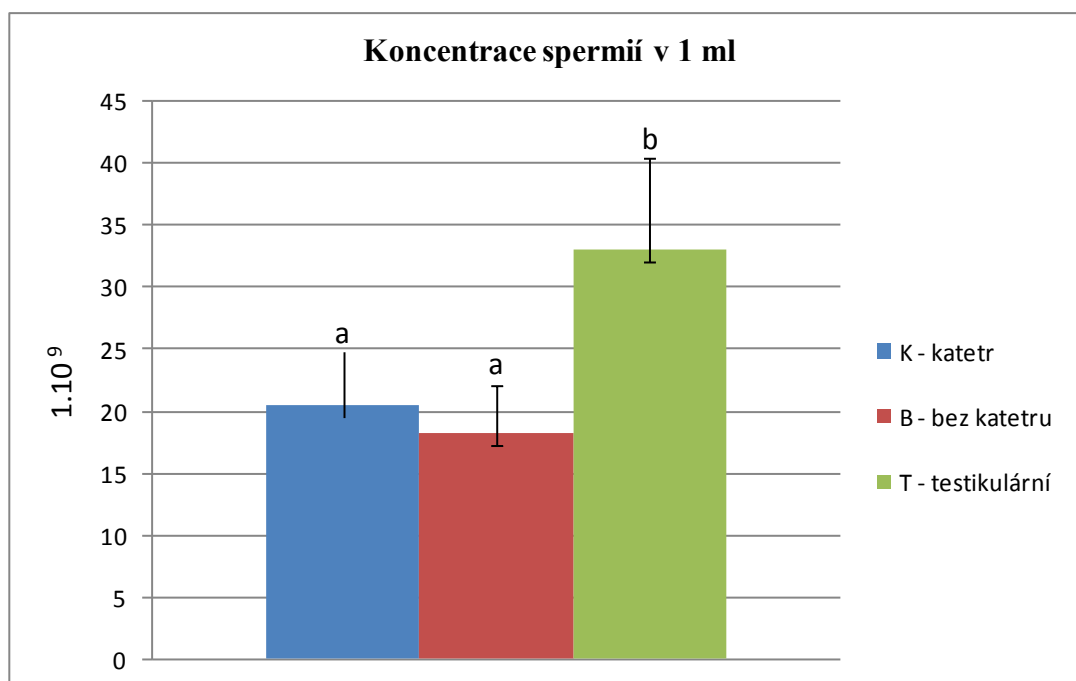
Objem odebíraného spermatu metodami pomocí katetru a bez katetru je znázorněn v tabulce č.1.

Tab. č.1 Průměrný objem odebraného spermatu na jednoho mláčáka

	V (ml)	V.kg ⁻¹ (ml)
Katetr	0,83 ± 0,494 a	0,889 ± 0,393 a
Bez katetru	1,06 ± 0,974 a	1,186 ± 0,953 a

Z tabulky č. 1 lze vyčíst, že při použití metody s katetrem byl průměrně odebrán menší objem spermatu oproti metodě vytlačovaného spermatu. Statistický rozdíl však mezi oběma skupinami nebyl signifikantní. Z tohoto výsledku vyplývá, že použitím katetru není možné odebrat větší objem spermatu pro následné použití k umělému osemenění.

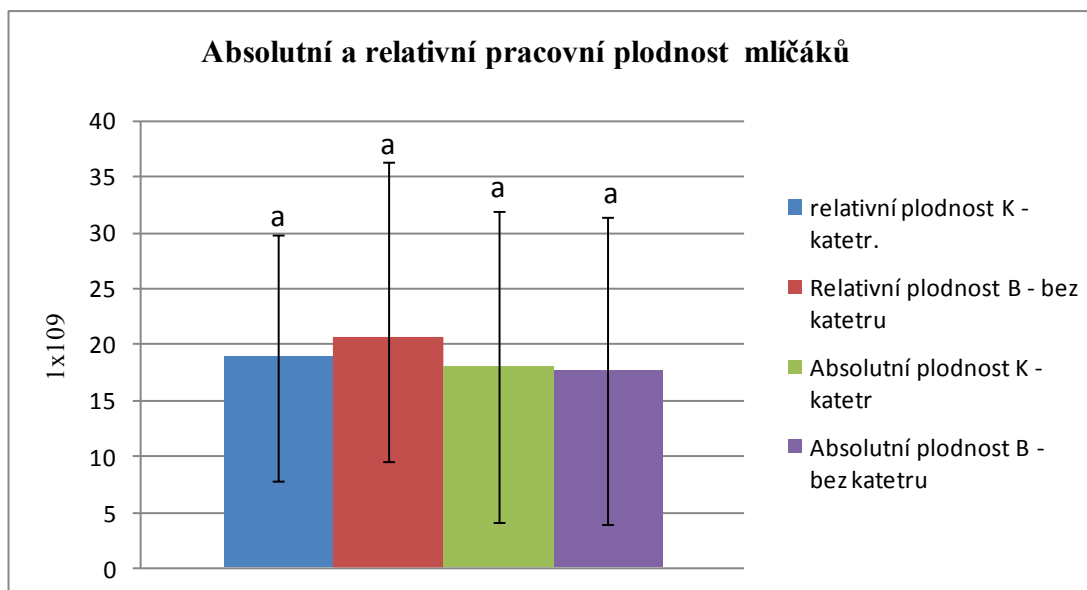
Koncentrace spermií v 1 ml spermatu mezi jednotlivými skupinami je znázorněna v grafu. č. 2.



Graf. č.2 Koncentrace spermií u mlíčáků při použití tří různých metdo získání spermatu

Nejvyšší koncentrace spermií v 1 ml se statisticky významným rozdílem oproti ostatním skupinám vykazuje testikulárně odebrané sperma ($33,041 \pm 7,453 \cdot 10^9$ spermií). Skupina katetru vykazuje vyšší koncentrace spermií ($20,47 \pm 4,26 \cdot 10^9$) než vytlačované sperma ($18,207 \pm 3,848 \cdot 10^9$ spermií), avšak bez statisticky významného rozdílu. I přes nižší objem odebraného spermatu metodou s katetrem je při použití kateru mírně vyšší průměrná koncentrace spermií oproti vytlačovanému spermatu. Na základě tohoto výsledku lze k umělému osetení doporučit použití testikulárního spermatu. V případě, že chceme zachovat mlíčáka k dalšímu výtěru, je na základě výsledků lepší použít sperma získané odběrem pomocí kateru, kterým lze získat vyšší koncentraci spermií než při běžném odběru spermatu pomocí masáže břišní dutiny.

Absolutní a relativní pracovní plodnost mlíčáků je znázorněna v grafu č. 3.



Graf č. 3 Plodnosti mlíčáků

Mezi oběma skupinami (K, B) nebyl v rámci plodnosti relativní ($18,0 \pm 11,04$ a $20,64 \pm 15,74 \cdot 10^9$ spermii) ani absolutní ($18,01 \pm 13,94$ a $17,71 \pm 13,72 \cdot 10^9$ spermii) pozorován statisticky významný rozdíl. Velmi podobné hodnoty pro plodnosti napovídají, že použitím katetru nelze získat větší množství spermatu. Nižší objem spermatu odebraného pomocí katetru je kompenzován vyšší koncentrací spermii, a tudíž se rozdíly v plodnosti mezi oběma skupinami blízkce podobají.

4.1.2 Plodnost jikernaček

Námi zjištěné hodnoty plodnosti jikernaček určených k oplozovacímu testu jsou znázorněny v tabulce č. 2. Absolutní a relativní pracovní plodnost včetně počtu jiker v 1g a hmotnost 1 jikry jsou uváděny v nenabobtnalém stavu.

Tab. č.2 Plodnosti jikernaček

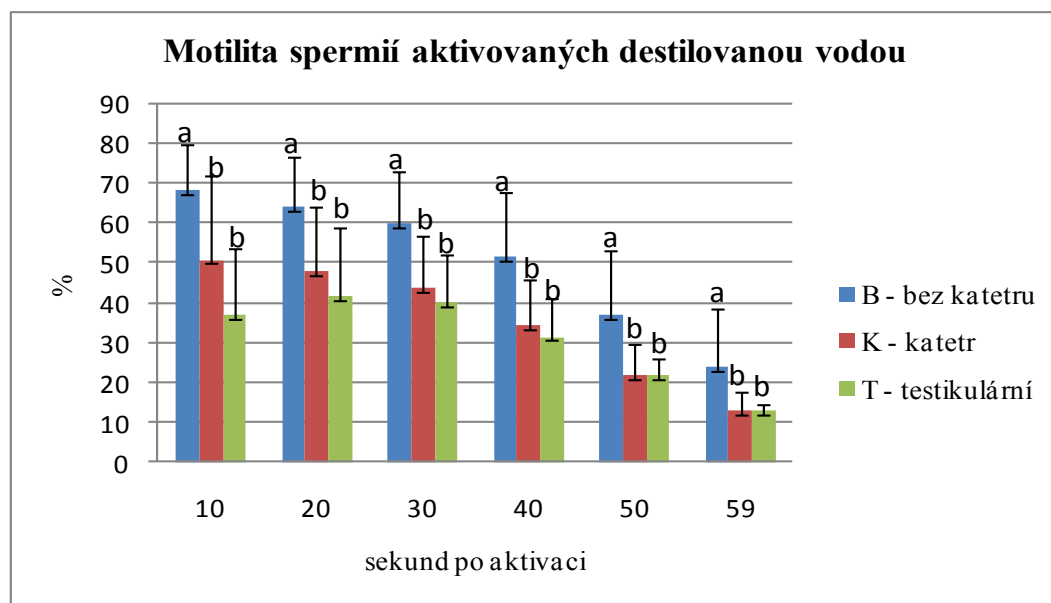
Absolutní pracovní plodnost (ks)	Relativní pracovní plodnost (ks.kg ⁻¹)	Jiker v 1 g (ks)	1 jikra (mg)
45212,11±6733,24	32471,62±8626,86	130,234±9,29	7,72±0,54

Absolutní pracovní plodnost se pohybovala u ryb vážících 1120 - 1617 g mezi 37862 a 54404 kusy jiker. Relativní pracovní plodnost se pohybovala od 24070 do 47178 kusů jiker.kg⁻¹.

4.2 Kvalita odebraných spermií - CASA analýza

4.2.1 Motilita - pohyblivost

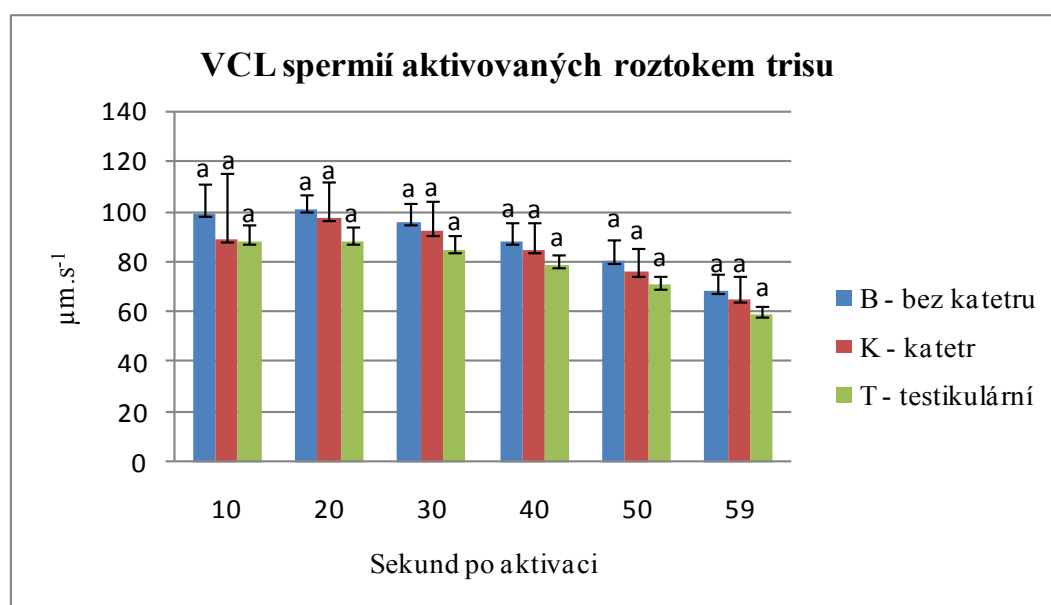
Procentický výskyt pohyblivých spermií pro jednotlivé skupiny odběru spermatu v aktivačním roztoku destilované vody jsou znázorněny v grafu č. 4. Procentický výskyt pohyblivých spermií pro aktivační roztok Trisu je vyobrazen v grafu č. 5.



Graf č. 4 Motilita spermií v aktivačním médiu destilované vodě u různě získaného spermatu

V grafu č.4 vidíme, jaké procento pohyblivých spermií se vyskytovalo v průběhu 60 sekund od aktivace destilovanou vodou. Nejvyšší procento pohyblivých spermií bylo pozorováno po 10 sekundách od aktivace u skupiny B (68,6 ± 11,52 %). Skupina K vykazovala nejvyšší pohyblivost po 10 sekundách od aktivace na úrovni 37,1 ± 16,9 %. Nejvyšší procento pohyblivých spermií bylo

u skupiny T pozorováno po 20 sekundách od aktivace na úrovni $41,73 \pm 17,26 \%$. U skupiny B a K můžeme pozorovat pozvolný pokles pohyblivosti již po uplynutí 10 sekund od aktivace. U skupiny T se pohyblivost po 10 sekundách mírně zvyšuje a zůstává stabilní do uplynutí přibližně 30 sekund od aktivace a pak pohyblivost také klesá. Statisticky významný rozdíl byl pozorován u skupiny B - bez katetru oproti skupinám K -katetru a T - testikulární, mezi kterými statisticky významný rozdíl v % pohyblivých spermií nebyl signifikantní. Po uplynutí 60 sekund dosahuje skupina B nejvyšší pohyblivosti ($24 \pm 14,4 \%$). Zatímco skupina K a T po 60 sekundách dosahuje pohyblivosti na úrovni přibližně 12 %.



Graf č. 5 motilita spermií v aktivačním médiu trisu

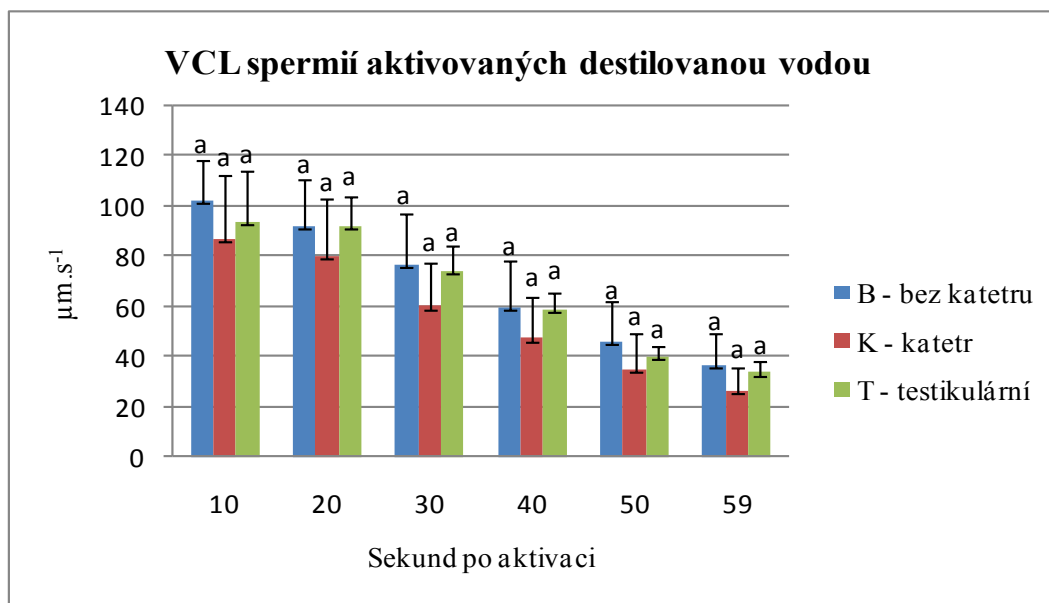
V případě aktivačního roztoku trisu můžeme nejvyšší pohyblivost skupiny B pozorovat po 40 sekundách od aktivace, kdy se ve vzorku pohybovalo $81,86 \pm 6,67 \%$ spermií. V průběhu celých 60 sekund od aktivace se pohyblivost spermií ze skupiny B pohybovala bez výraznějšího poklesu na úrovni přibližně 80 %. Pohyblivost spermií skupiny K byla téměř stabilní celých 60 sekund s nejvyšší pohyblivostí po 40 sekundách, kdy se ve vzorku pohybovalo $61,84 \pm 20,04 \%$ spermií. Nejnížší hodnoty pohyblivých spermií byly pozorovány opět u skupiny T, kdy nejvyššího procenta pohyblivých spermií ($58,41 \pm 10,98 \%$) bylo dosaženo po uplynutí 30 sekund od aktivace. Nejnížší pohyblivosti ($47,61 \pm 12,96 \%$) pak

testikulární sperma dosáhlo po 10 sekundách. Statistický významný rozdíl byl opět pozorován u skupiny B - bez katetru oproti skupinám K - katetr a T - testikulární během celých 60 sekund od aktivace.

V aktivačním médiu trisu dosahovaly hodnoty % pohyblivých spermií u všech tří skupin statisticky vyšších hodnot oproti aktivačnímu médiu destilované vodě. Z těchto grafů lze na základě výsledků vyvodit, že osmolalita prostředí (aktivačních roztoků) má velký vliv na aktivaci a následnou samotnou pohyblivost spermií. Z tohoto důvodu se k aktivaci spermatu nehodí destilovaná voda, u které dochází u spermií k nejnižší motilitě, a také dochází k rychlému vyčerpání energie spermií. Poklesem energie v destilované vodě se pohyblivost velmi rychle snižuje, zatímco v prostředí s mírně vyšší osmolalitou se pohyblivost spermií během 60 sekund téměř nemění. Tato skutečnost je velmi důležitá a pozitivní při umělém osemeňování jiker. Dále co se týče pohyblivosti, je na základě tohoto experimentu nevhodnější k umělému osemenění použít klasicky vytlačované sperma bez katetru (B) z důvodů jeho nejvyšší pohyblivosti.

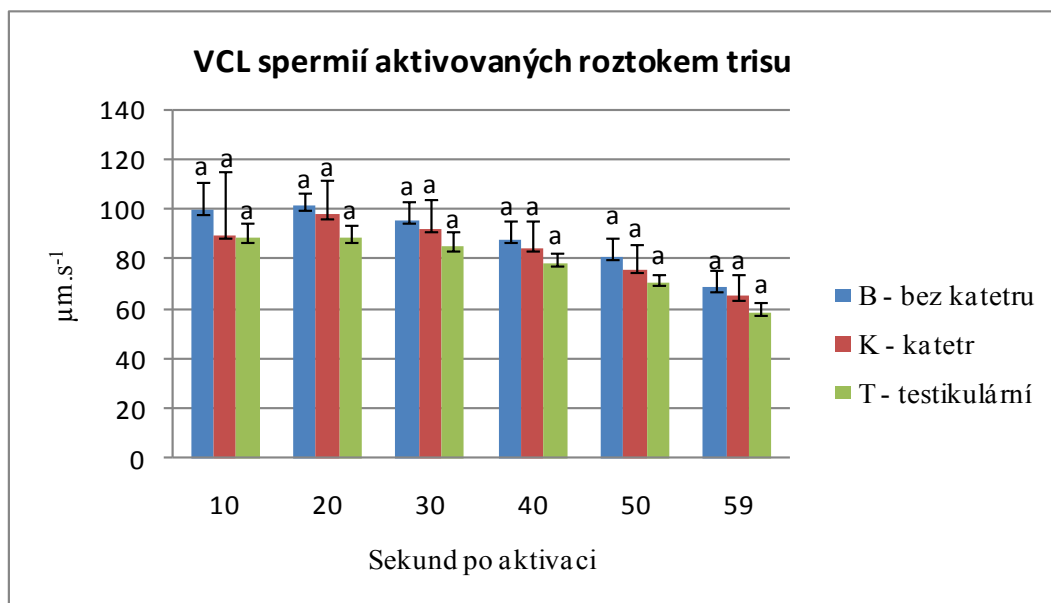
4.2.2 VCL - Curvilinear velocity

Hodnoty křivočaré rychlosti (VCL) spermií jednotlivých skupin odběru spermatu v destilované vodě během 60 sekund po aktivaci jsou znázorněny v grafu č.6. Hodnoty křivočaré rychlosti spermií po aktivaci roztokem trisu jsou znázorněny v grafu č. 7



Graf č. 6 VCL v aktivačním médiu destilované vodě

V grafu č. 6 můžeme vidět poměrně vyrovnaný průběh křivočaré rychlosti u jednotlivých skupin (B, K, T). U všech tří skupin byla křivočará rychlost nejvyšší po 10 sekundách od aktivace. Nejvyšší křivočará rychlost byla pozorována u skupiny B a to na úrovni $102 \pm 16,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Testikulární sperma (T) vykazovalo po aktivaci nejnižší pokles křivočaré rychlosti oproti skupinám K a B. Nejnižších hodnot dosahovalo po celou dobu sperma skupiny K. Statisticky významný rozíl v křivočaré rychlosti však mezi skupinami nebyl signifikantní.



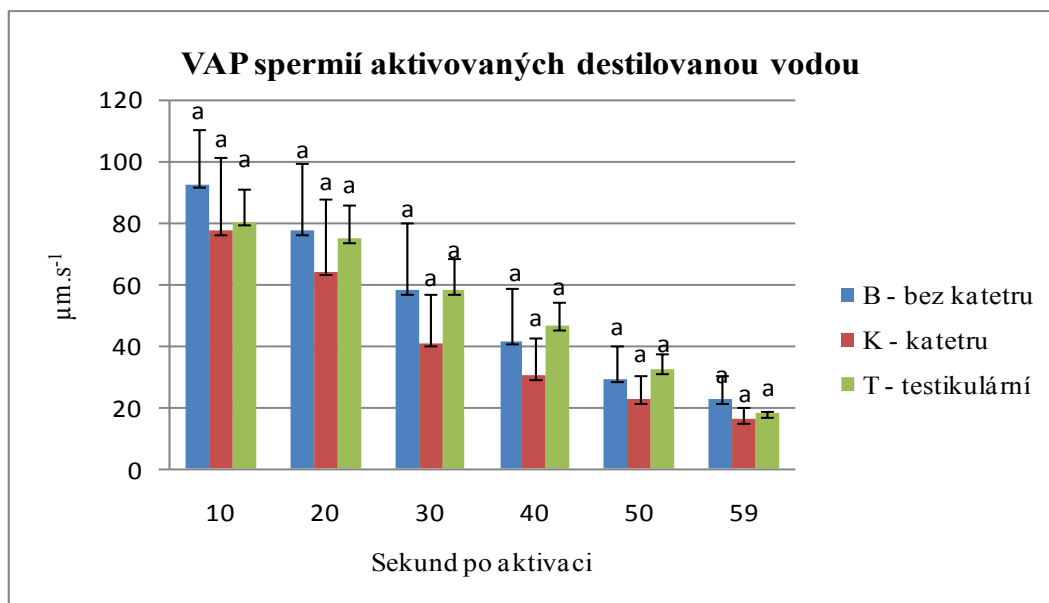
Graf č. 7 VCL v aktivačním médiu trisu

Při použití aktivačního roztoku trisu, vykazovala nejvyšší křivočarou rychlost skupina B. Mírně nižší rychlost pak vykazovala skupina K a nejnižších hodnot dosahovala skupina T. Oproti vzorkům aktivovaným destilovanou vodou, vykazovaly všechny skupiny aktivované roztokem trisu mírnější pokles rychlosti s nejnižší rychlostí po 60 sekundách od aktivace na úrovni přibližně 60 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Statisticky významný rozíl v rámci této skupiny nebyl pozorován.

V aktivačním médiu trisu byly pozorovány statisticky vyšší hodnoty křivočaré rychlosti u skupiny B a K než v aktivačním médiu destilované vodě. Z tohoto výsledku lze vyvodit, že z hlediska křivočaré rychlosti není mezi jednotlivými skupinami odběru spermatu významný rozdíl. Co se týče aktivačního roztoku, je opět z důvodu nižší rychlosti s výrazným poklesem rychlosti od aktivace spermií nevhodné používat k aktivaci destilovanou vodu.

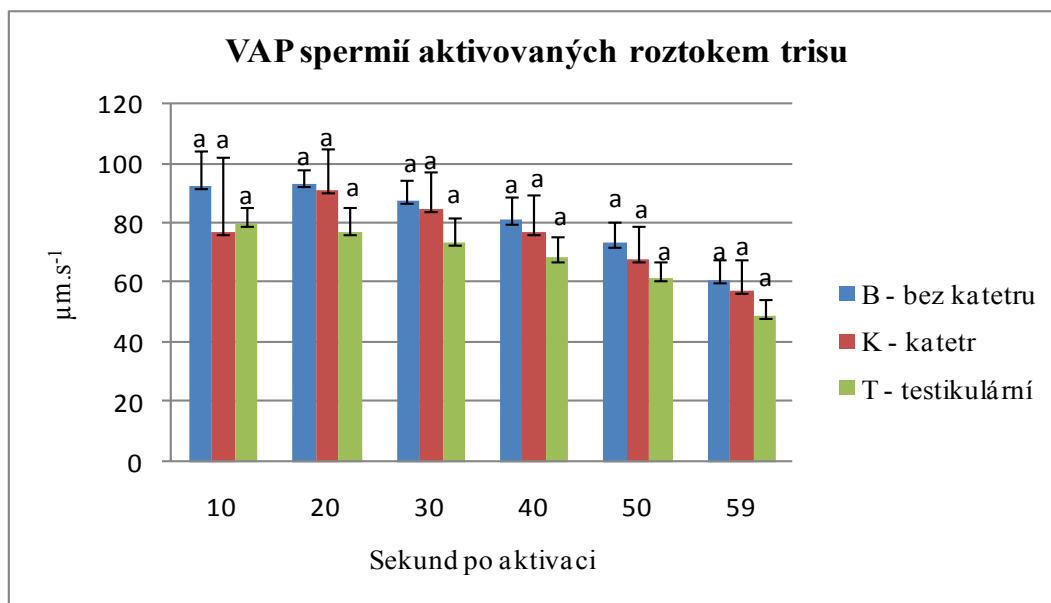
4.2.3 VAP - average path velocity

Průměrná rychlost úhlové dráhy spermií z jednotlivých skupin v aktivačním médiu destilované vodě je znázorněna v grafu č. 8. V grafu č. 9 je vyobrazena průměrná rychlost úhlové dráhy pro spermie aktivované roztokem trisu.



Graf č. 8 VAP aktivační médium destilovaná voda

Nejvyšší rychlost úhlové dráhy dosahovaly spermie ze skupiny B a to po 10 sekundách od aktivace, kdy byla průměrná úhlová rychlost na úrovni $93 \pm 17,9 \mu\text{m.s}^{-1}$. Nejnižší hodnoty rychlosti dosahovalo sperma skupiny K, kdy po 10 sekundách od aktivace byla rychlost na úrovni přibližně $77 \pm 24,1 \mu\text{m.s}^{-1}$, oproti tomu skupina T vykazovala průměrnou rychlost po 10 sekundách od aktivace na úrovni $80 \pm 11 \mu\text{m.s}^{-1}$. Obě skupiny B a K vykazovaly po aktivaci pokles rychlosti až na úroveň $20 \mu\text{m.s}^{-1}$ po uplynutí 60 sekund. U skupiny T můžeme pozorovat mírnější pokles úhlové rychlosti než u skupin B a K. Po 60 sekundách se úhlová rychlost u všech tří skupin pohybuje na úrovni $20 \mu\text{m.s}^{-1}$. Statistický rozdíl nebyl mezi jednotlivými skupinami pozorován.



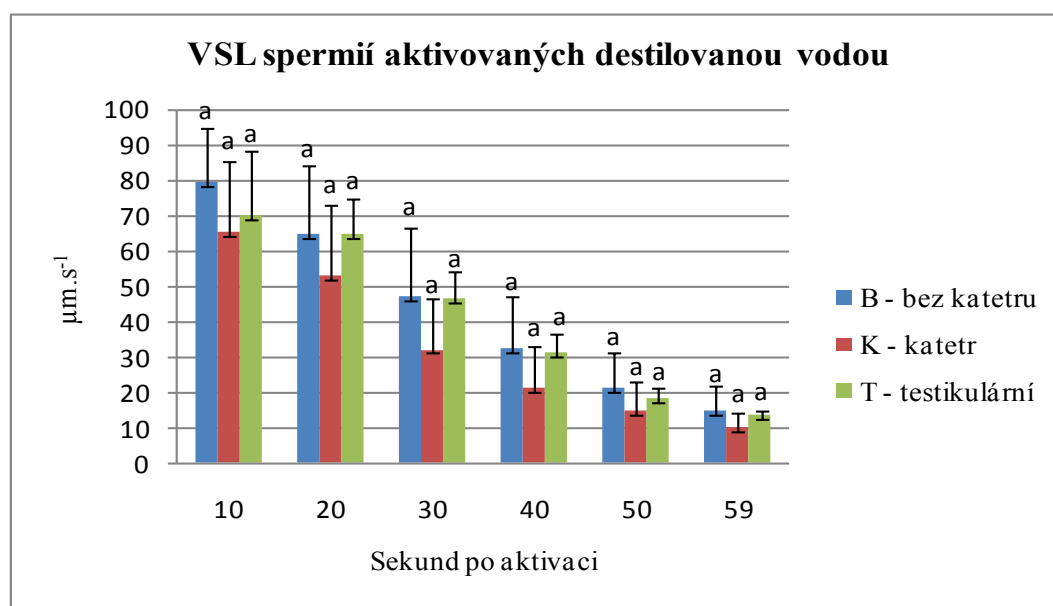
Graf č. 9 VAP v aktivačním médiu trisu

U aktivačního média trisu můžeme pozorovat podobné trendy vývoje úhlové rychlosti u všech tří skupin, kdy nejvyšších rychlostí dosahuje skupina B ($92,76 \pm 11,6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) a nejnižší rychlosti dosahuje skupina K ($77,4 \pm 24,77 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) a T ($80,26 \pm 4,92 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). U skupiny B a T můžeme pozorovat mírnější pokles rychlosti než po aktivaci destilovanou vodou. U skupiny K lze pozorovat nárůst úhlové rychlosti po 20 sekundách až téměř na úroveň skupiny B. Poté ale dochází jako u ostatních skupin k poklesu úhlové rychlosti. Konečná rychlost po 60 sekundách je u všech skupin na úrovni 50 - 60 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Statistický rozdíl v rychlosti nebyl pozorován ani u jedné skupiny odběru.

V aktivačním médiu trisu byl u všech tří skupin odběru pozorován statisticky významný rozdíl v úhlové rychlosti oproti aktivačnímu médiu destilované vodě od 20 sekund po aktivaci. Opět zde lze pozorovat velké rozdíly mezi jednotlivými aktivačními médii. Kdy v případě použití destilované vody je pokles rychlosti nejvyšší. Zatímco u aktivačního roztoku trisu dochází k pozvolnému poklesu rychlosti.

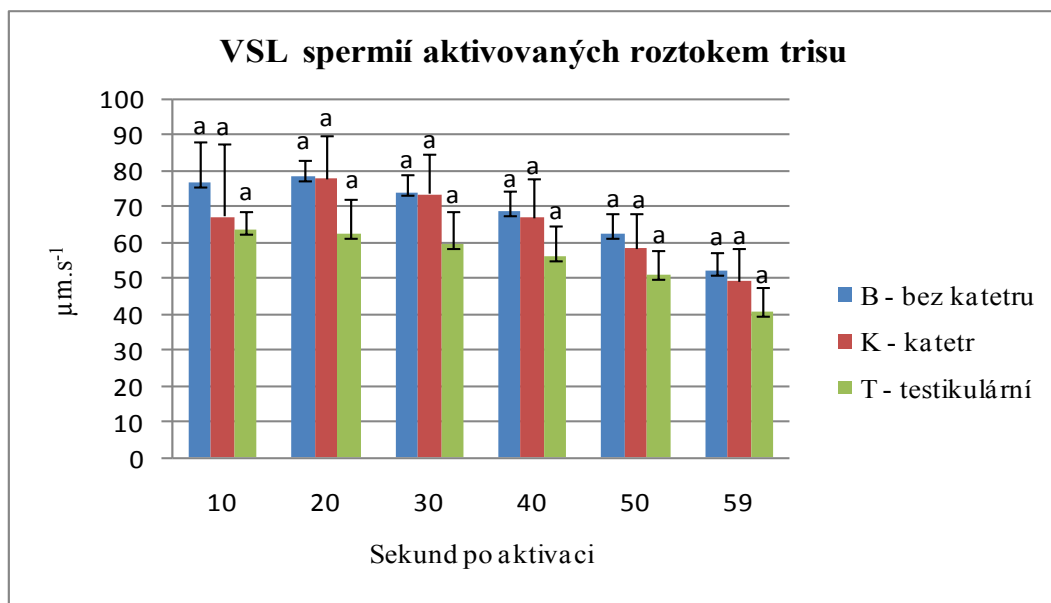
4.2.4 VSL - straight-line velocity

Lineární rychlost pro všechny skupiny spermatu v aktivačním médiu destilované vodě je vyobrazena v grafu č. 10. Lineární rychlost pro aktivační médium trisu je vyobrazena v grafu č. 11.



Graf č. 10 VSL v aktivačním médiu destilavné vodě

Nejvyšších hodnot lineární rychlosti dosahuje skupina B, kdy po 10 sekundách od aktivace dosahuje lineární rychlost $79,42 \pm 15,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Nejnižší lineární rychlosti dosahuje skupina K a to $65,5 \pm 19,69 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 10 sekundách od aktivace. Po uplynutí 20 sekund vykazují všechny skupiny výrazný pokles lineární rychlosti až pod $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách od aktivace. Statisticky významné rozdíly však mezi jednotlivými skupinami nejsou.



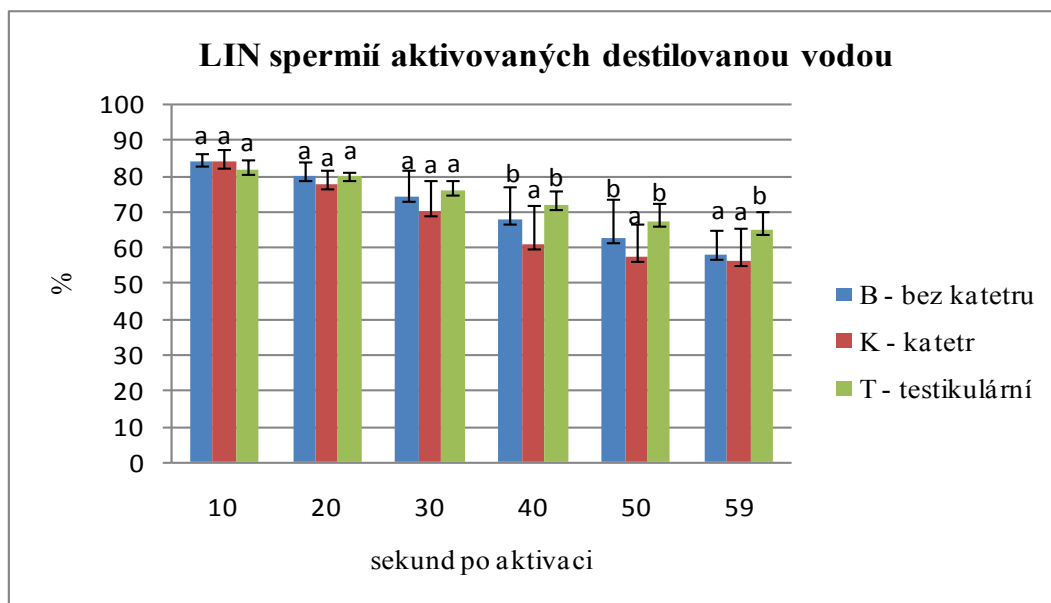
Graf č. 11 VSL v aktivačním médiu trisu

U aktivačního média trisu dosahovala nejvyšší lineární rychlosti po 10 sekundách od aktivace skupina B ($76,85 \pm 11,75 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), následována skupinou K ($67,48 \pm 20,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Nejnižší lineární rychlost vykazovala skupina T ($63,8 \pm 4,98 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). U skupiny B můžeme pozorovat mírný pokles rychlosti od 20 sekund od aktivace. U skupiny K se rychlost prvních 20 sekund zvyšovala a poté nastává stejný pokles rychlosti jako u skupiny B. Testikulární sperma (T) vykazuje pozvolný pokles ji od 10 sekund po aktivaci. Po 60 sekundách od aktivace byla lineární rychlost na úrovni přibližně $40 - 50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u všech pozorovaných skupin. Statisticky významné rozdíly však mezi skupinami nejsou signifikantní.

V aktivačním médiu trisu byly pozorovány statisticky vyšší hodnoty lineární rychlosti u skupiny K a B než v aktivačním médiu destilované vodě. Skupina T vykazuje v aktivačním médiu trisu statisticky vyšší hodnoty lineární rychlosti od 30 sekund po aktivaci oproti destilované vodě.

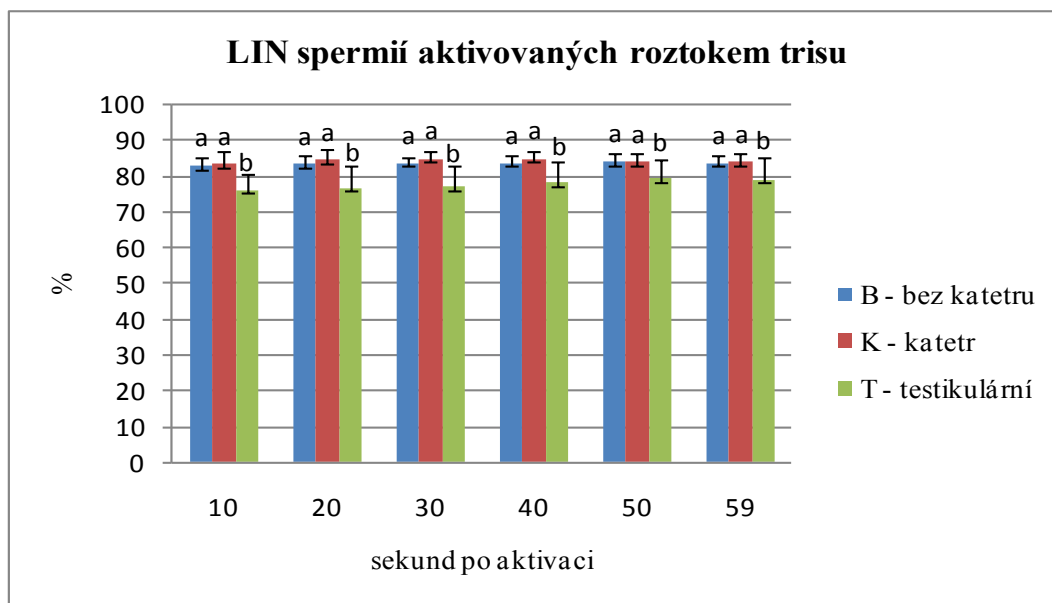
4.2.5 LIN - linearity

Linearita pro všechny skupiny spermatu v aktivačním médiu destilované vodě je znázorněna v grafu č. 12. Linearita pro skupiny s aktivačním médiem trisu je vyobrazena v grafu č. 13.



Graf č. 12 Linearita v aktivačním médiu destilované vodě

V grafu č. 12 je vyobrazen vývoj přímočarosti spermíí pro všechny 3 skupiny spermatu. Po 10 sekundách od aktivace byla linearita u všech tří skupin na přibližně stejné úrovni. Nejvyšší pokles linearity lze pozorovat u skupiny K. Nejvyšších hodnot linearity a nejnižšího poklesu dosáhla skupina T, zatímco nejnižší hodnoty byly naměřeny u skupiny K. Statisticky významný rozdíl byl pozorován od 40 sekund po aktivaci u skupiny T a B oproti skupině K. Po 59 sekundách byl statisticky významný rozdíl pozorován u skupiny T oproti skupinám K a B. Snižující se linearita je způsobena zkroucením bičíku spermie vlivem nízké osmolality, a tak dochází k většímu zakřivení dráhy pohybu.

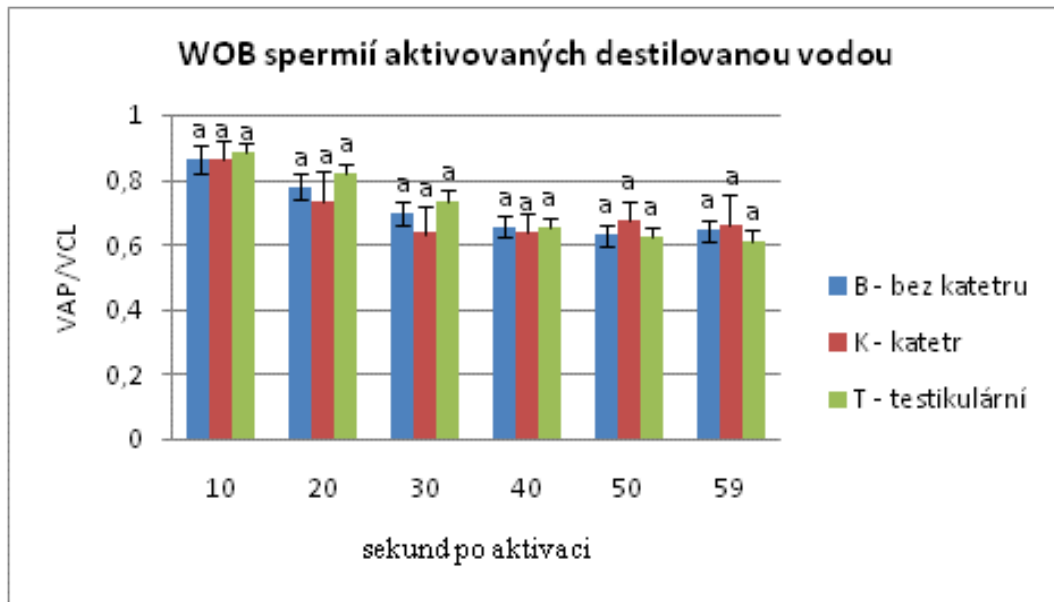


Graf č. 13 Linearita v aktivačním médiu trisu

U aktivačního média trisu dosahovala nejvyšší přímočarosti skupina K ($83,53 \pm 3,76 \%$) a B ($83,03 \pm 2,17 \%$) bez statistický významného rozdílu. Statisticky nejnižší přímočarost oproti skupině K a B vykazovala skupina T ($76,14 \pm 4,28 \%$). U všech skupin lze pozorovat téměř stabilní linearitu od 10 sekund od aktivace až po konec měření, tedy do 60 sekund. V rámci aktivačního média trisu dosahovaly statisticky významného rozdílu oproti aktivačnímu médiu destilované vodě skupiny K a B.

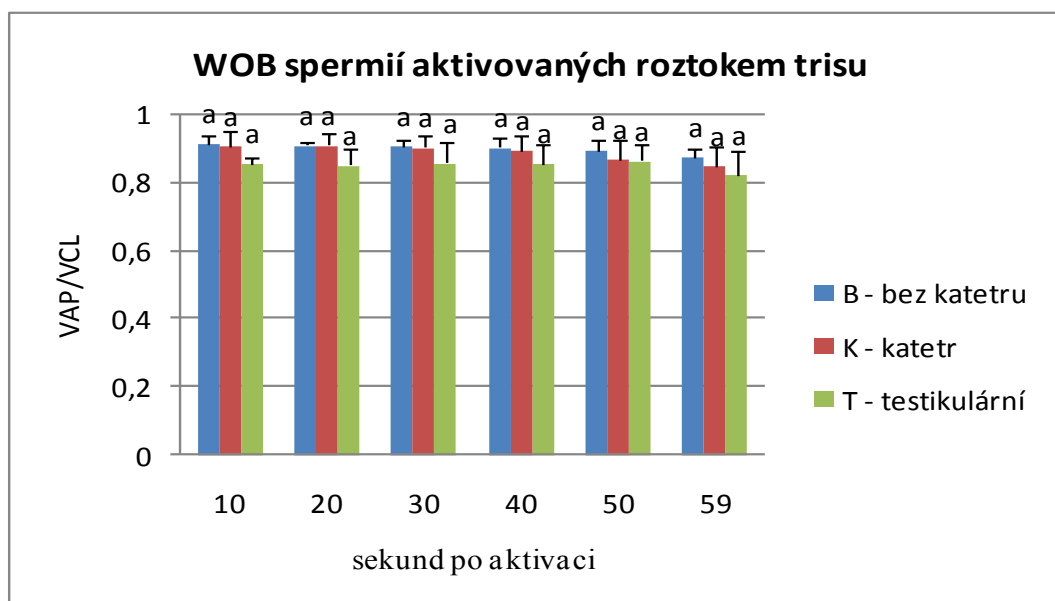
4.2.6 WOB - wobble

Zvlnění pohybu spermíí aktivovaných destilovanou vodou je vyobrazeno v grafu č. 14 a zvlnění pohybu po aktivaci roztokem trisu je vyobrazeno v grafu č 15.



Graf č. 14 Wobble v aktivačním médiu destilované vodě

Zvlnění pohybu je vyjádřeno jako poměr VAP/VCL. Průběh zvlnění pohybu byl u všech tří pozorovanch skupin velice podobný, nejnižší zvlnění pohybu ($0,86 \pm 0,05 - 0,88 \pm 0,04$) bylo pozorováno během prvních 10 sekund od aktivace u všech tří skupin. Poté dochází ke většímu zvlnění pohybu u všech tří skupiny až na úroveň přibližně 0,6.

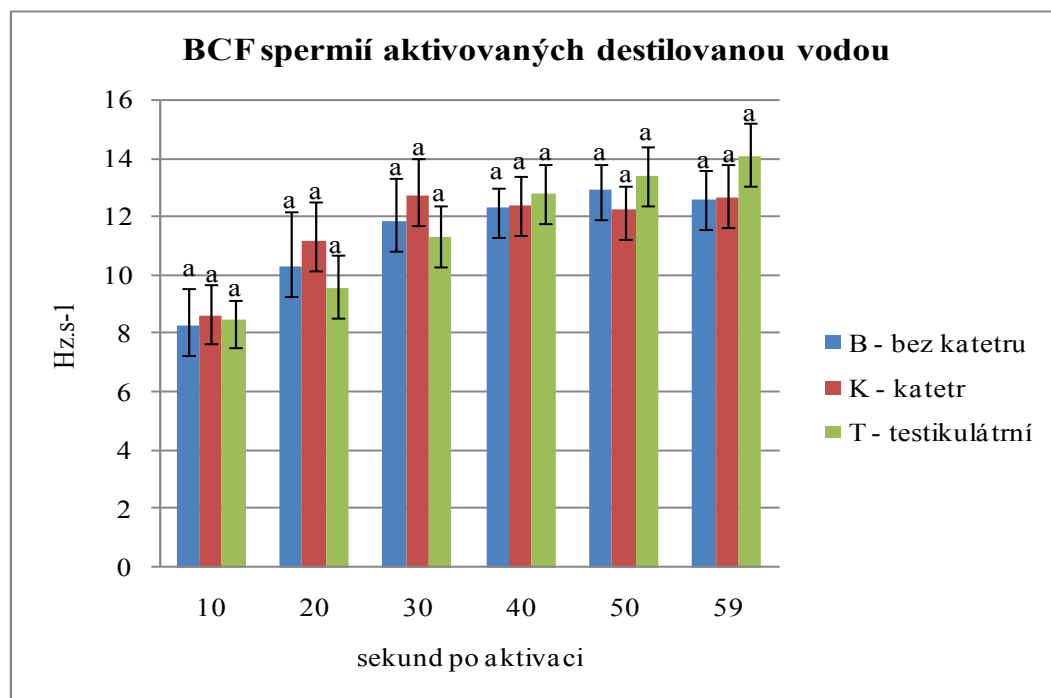


Graf č. 15 Wobble v aktivačním médiu trisu

Po aktivaci spermií roztokem trisu nedošlo k prakticky žádné změně od počátku aktivace do konce měření a všechny skupiny vykazují obdobné hodnoty. V rámci aktivačního média trisu je u všech pozorovaných skupin statisticky významný rozdíl ve zvlnění pohybu oproti aktivaci destilovanou vodou.

4.2.7 BCF - Beat cross frequency

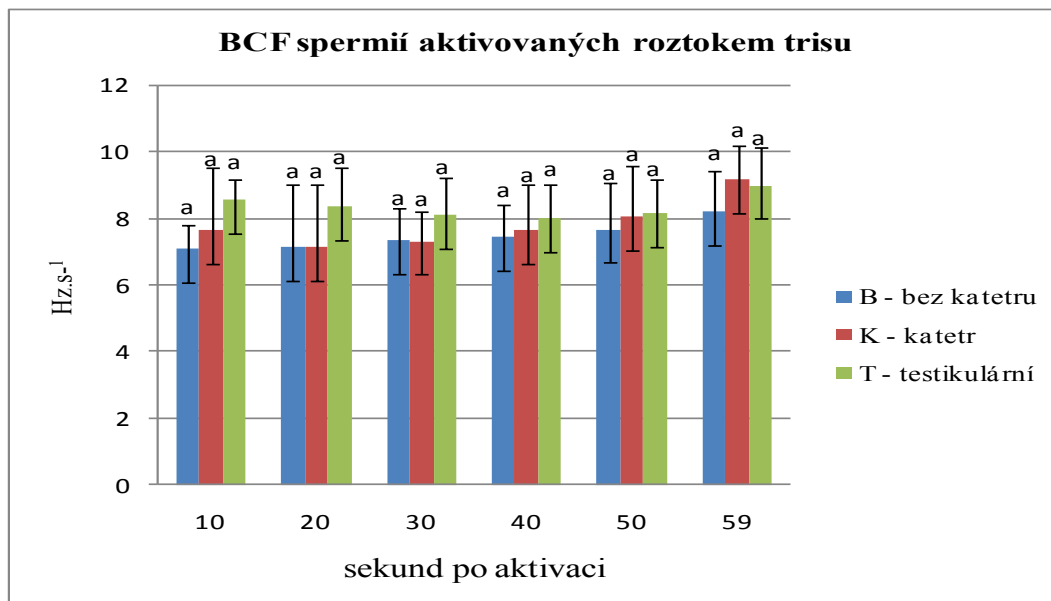
Frekvence úderů bičíku při použití aktivačního média destilavé vody je vyobrazena v grafu č. 16 a při použití aktivačního média trisu je zázorněna v grafu č. 17.



Graf č. 16 Beat cross frequency v aktivačním médiu destilované vodě

Frekvence úderů spermie vykazuje od 10 sekund po aktivaci u všech tří skupin vzrůstající tendenci z přibližně 8 Hz.s⁻¹ na úroveň 12,5 - 14 Hz.s⁻¹ po 60 sekundách od aktivace. Statisticky významný rozdíl nebyl mezi jednotlivými skupinami pozorován. Zvýšená frekvence úderů spermií koresponduje s poklesem přímočarosti a navyšováním zvlnění spermií, jak lze pozorovat u předchozích výsledků. Tento výsledek je způsoben již zmíněným deformováním bičíku vlivem

nízké osmolality a tak dochází ke snížení efektivní délky bičíku a zvyšuje se rychlost úderů.



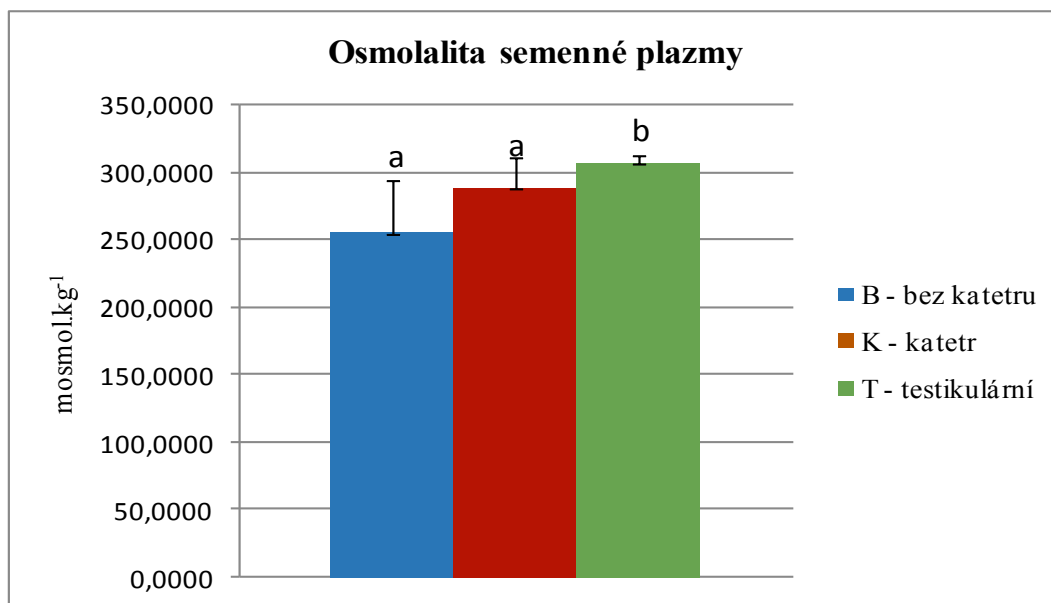
Graf č. 17 Beat cross frequency v aktivačním médiu trisu

Po aktivaci roztokem trisu frekvence úderů spermie dosahuje podobných počátečních hodnot (7 - 8,3 $\text{Hz}\cdot\text{s}^{-1}$), jako u spermií aktivovaných destilovanou vodou. U roztoku trisu však nedochází k nárůstu frekvence úderů jako u destilované vody ihned po aktivaci. Mírný nárůst lze pozorovat až po uplynutí přibližně 50 sekund na úroveň 8 - 9 $\text{Hz}\cdot\text{s}^{-1}$. Statisticky významný rozdíl nebyl v rámci skupin pozorován.

Po aktivaci roztokem trisu dosahovaly všechny skupiny odběru statisticky nižších hodnot frekvence úderů než po aktivaci destilovanou vodou.

4.3 Osmolalita semenné plazmy

Změřené hodnoty osmolality semenné plazmy pro jednotlivé skupiny odběru spermatu jsou vyobrazeny v grafu č. 18.



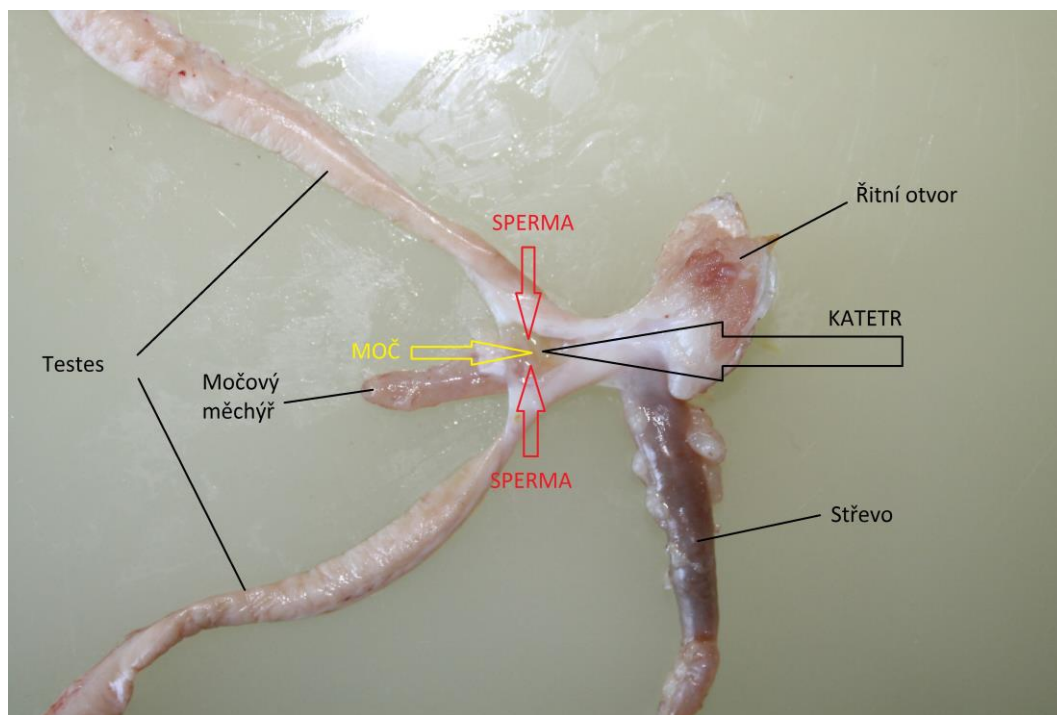
Graf č. 18 Osmolalita semenné plazmy

Z grafu osmolalit lze vyčíst, že nejnižší osmolalita a tak i nejvyšší kontaminace močí je u metody odběru spermatu B, osmolalita semenné plazmy spermatu u metody K vykazuje vyšší osmolalitu než metoda B, ale signifikantní rozdíl zde nebyl prokázán. Testikulární sperma (T) dosahuje nejvyšších hodnot osmolality, signifikantně vyšších než u skupin B a K. Nejnižší osmolalita skupiny B dokazuje, že při klasickém odběru vytlačovaného spermatu dochází ke kontaminaci močí. U skupiny K je sice osmolalita vyšší než u skupiny B, ale je patrné, že i zde dochází ke kontaminaci spermatu močí.

4.4 Anatomie močopohlavních cest

Vypreparované močopohlavní cesty jsou vyobrazeny na obr č. 9. Červené a žluté šipky znázorňují, kam dochází k uvolňování spermatu a moči během abdominální masáže. Černá šipka ukazuje odkud je odebíráno sperma pomocí katetru. Z anatomie vývodných cest je vidět, že moč a sperma odcházejí stejnou cestou, tudíž není možné se 100% vyvarovat kontaminaci spermatu močí. Při masáži břišní dutiny dochází ke stlačení i močového měchýře ze kterého dojde k uvolnění moči a smísení s vytlačovaným spermatem. Při pokusu s vývodnými cestami jsme dále zjistili, že není možné katetr zasunout bez poškození tkání přímo do vývodné

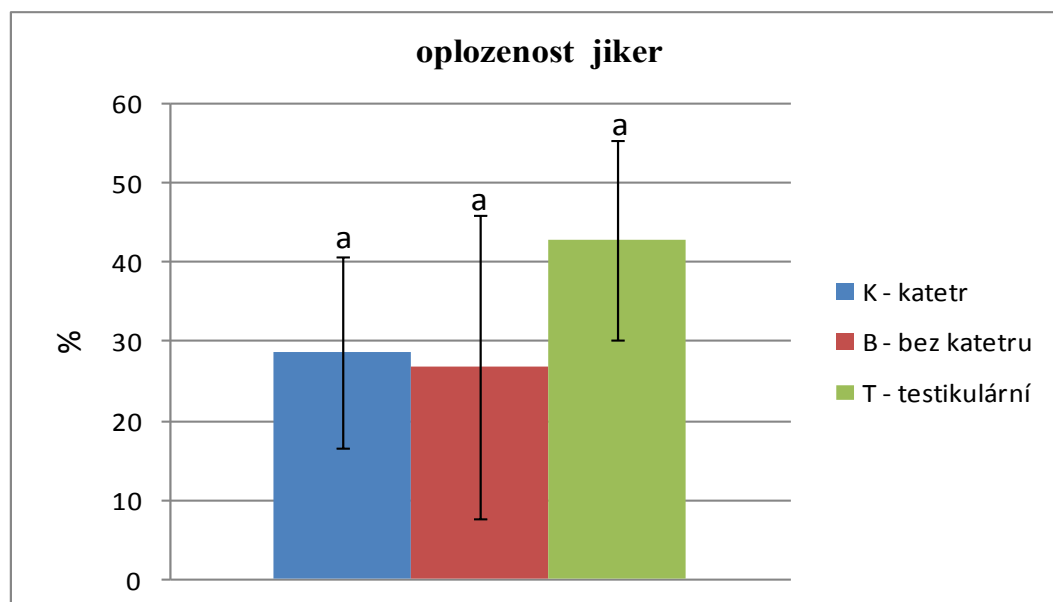
cesty jednoho z varlat. Z tohoto důvodu není možné odebrat sperma bez kontaminace močí. Katetr lze při nešetrném zacházení zasunout do močového měchýře a může dojít i k jeho porušení nebo k porušení tkání a tak i ke zranění generační ryby.



Obr.č. 9 - Vypreparované vývodné cesty při zkoumání průchodnosti katetru

4.5 Oplozenost jiker

Oplozenost larev po uplynutí 30 °D je znázorněna v grafu č. 19.



Graf č. 19 Oplozenost jiker

Statisticky významný rozdíl v oplozenosti jiker mezi jednotlivými skupinami nebyl signifikantní. Nejvyšší oplozenost vykazuje skupina T ($42,94 \pm 12,53\%$). Skupina K vykazuje téměř stejnou průměrnou oplozenost ($28,671 \pm 12,12\%$) jako skupina B ($26,871 \pm 19,145\%$).

Z tohoto výsledku vyplývá, že na oplozenost jiker nemá metoda odběru prokazatelný vliv. Z důvodu mírně vyšší oplozenosti oproti ostatním skupinám se jeví být testikulární sperma k umělému osemenění vhodnější. Mezi spermatem odebraným katetrem a spermatem odebraným bez katetru nejsou patrné výraznější rozdíly v jeho schopnosti oplození.

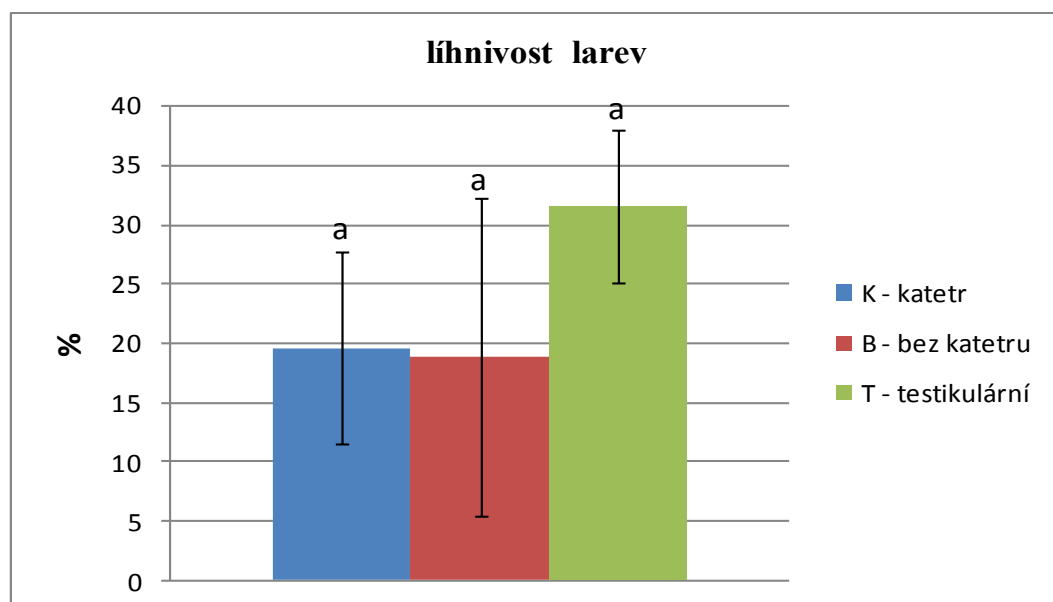
4.5 Líhivost larev

Začátek a konec líhnutí larev je vyobrazen v tabulce č.2. Líhivost larev v oplozovacím testu je vyobrazena v grafu č.20.

Tab. č.2 Inkubační doba

Teplota inkubace (°C)	Začátek kuliní (°D)	Konec kuliní (°D)
10,589 ± 0,472	115,602 ± 5,511	136,997 ± 5,179

Doba inkubace byla během tohoto experimentu celkem 136,997 °D, tato inkubační doba odpovídala celkem 12,951 ± 0,678 dní. Líhivost larev je pak znázorněna v grafu č. 20.



Graf č.20 Líhivost larev

Výsledky líhivosti mají stejný trend jako výsledky oplozenosti. Mezi jednotlivými skupinami odběru nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Nejvyšší líhivostí bylo dosaženo u skupiny T. Skupina K vykazuje téměř shodnou průměrnou líhivost jako skupina B. Nejvyšší rozdíly v líhivosti v rámci skupiny bez katetru byly pravděpodobně způsobeny snížením kvality spermatu různou kontaminací močí.

5. DISKUSE

V průběhu diplomové práce byl realizován experiment, který porovnával kvalitu spermatu odebíraného třemi různými metodami. První metodou bylo klasicky vytlačované sperma (B) masáží břišní dutiny. Druhým způsobem byl odběr spermatu pomocí katetru (K) zavedeného do urogenitální papily generačního mlíčka. Třetím způsobem byl odběr testikulárního spermatu (T) u předem zabitého mlíčka

5.1 Plodnost generačních ryb

Množství odebraného spermatu bylo porovnááno mezi skupinou B - bez katetru a K - katetrem. Největšího objemu odebíraného spermatu bylo dosaženo u skupiny B a to průměrných $1,186 \pm 0,953 \text{ ml.kg}^{-1}$ oproti průměrným $0,889 \pm 0,393 \text{ ml.kg}^{-1}$ skupiny K. Statisticky významný rozdíl však mezi oběma skupinami nebyl signifikantní. Tento objem odebraného spermatu koresponduje například s výsledky Huláka a kol. (2008), který uvádí množství odebraného vytlačovaného spermatu v průměru $1,2 \pm 0,8 \text{ ml.kg}^{-1}$ a s výsledky Linharta (1984), který uvádí množství odebraného spermatu od 0,5 do 2,5 ml. Bondrarenko a kol. (2014) uvádí množství odebraného spermatu od 0,3 ml napočátku výtěrové sezony s nárůstem na 1,35 ml ke konci výtěrového období. Billard (1996) udává maximální objem odebraného spermatu na úrovni 3 ml. Větší množství odebraného spermatu metodou B - bez katetru mohlo být také ovlivněno větší kontaminací daného spermatu močí, jak vypovídají i naše výsledky z hodnocení osmolality semenné plazmy.

Co se týče koncentrace spermií v jednotlivých vzorcích od všech tří skupin metod odběru, dosáhlo signifikantně nejvyšší koncentrace spermií v 1 ml sperma skupiny T s průměrným počtem $33,04 \pm 7,45 \cdot 10^9$ spermií. Nejnižší koncentrace spermií v 1 ml dosáhlo sperma ze skupiny B a to s průměrným počtem $18,2 \pm 3,84 \cdot 10^9$ spermií. U skupiny K byla zjištěna průměrná koncentrace spermií $20,47 \pm 4,42 \cdot 10^9$ spermií v 1 ml. Mezi skupinou K a B však nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Koncentrace spermií v této diplomové práci odpovídají i výsledkům Huláka a kol (2008), který uvádí ve svém experimentu koncentrace spermií u testikulárního spermatu v průměru $34 \pm 5 \cdot 10^9$ spermií v 1 ml. Koncentraci

spermií vytlačovaného spermatu pak uvádí v průměru 24 ± 4.10^9 spermií v 1 ml. Bondarenko a kol. (2014) udává koncentraci spermií v 1 ml na úrovni 23.10^9 . Rozdíly mezi koncentracemi spermií v rámci pozorovaných skupin byly způsobeny rozdílnou kontaminací spermatu močí a tak došlo i k naředění spermatu. To potvrzují i výsledky z osmolality, kdy nejvyšší kontaminace spermatu močí byla u skupiny B - bez katetru a nejnižší kontaminace u skupiny T - testikulární.

Plodnosti jikernaček zjištěné v rámci oplozovacího testu byly v tomto experimentu vyhodnoceny jako absolutní pracovní plodnost a relativní pracovní plodnost. Absolutní pracovní plodnost byla zjištěna z celkového množství odebraných jiker na jednu využívanou jikernačku a dosahovala v průměru $45212,11 \pm 6733,24$ kusů jiker s nejnižší absolutní plodností na úrovni 37862 kusů jiker a nejvyšší plodností na úrovni 54404 kusů jiker. Relativní plodnost byla pak v průměru $32471,6 \pm 8626,86$ kusů jiker.kg⁻¹ s nejnižší relativní plodností 24070 jiker.kg⁻¹ a nejvyšší relativní plodností na úrovni 47187 jiker.kg⁻¹. Námi zjištěné výsledky absolutní pracovní plodnosti odpovídají hodnotám absolutních pracovních plodností zjištěných Billardem (1996), který uvádí absolutní plodnost u ryb ve velikosti 325 - 1000 mm od 6000 - 250000. Absolutní plodnost je ovlivněna hlavně stářím a velikostí ryby, kdy naše generační ryby dosahovali průměrné délky $566,750 \pm 38,45$ mm, zatímco maximální hodnota 250000 kusů jiker u Billarda připadala na ryby blížící se velikosti 1000 mm. Z tohoto důvodu byla v našem pokusu maximální absolutní plodnost nižší, ale spadá do daného intervalu hodnot. Co se týče relativní plodnosti, spadají námi zjištěné hodnoty do intervalu hodnot zjištěných Křišťanem a kol (2013) a Barušem a Olivou (1995), kteří uvádějí relativní plodnost od 20 857 - 49901 kusů jiker.kg⁻¹.

5.2 Pohyblivost

Z hodnocení kvality spermatu, konkrétně z hodnocení pohyblivosti (Motility) spermií, dosáhlo v našem experimentu nejvyššího procenta pohyblivých spermií sperma odebrané bez použití katetru (B) a to u obou aktivačních roztoků. U destilované vody byla nejvyšší pohyblivost spermií zaznamenána během prvních 25 sekund, kdy bylo pohyblivých průměrně 65% spermií, poté pohyblivost klesla

až na úroveň 20 %. V aktivačním médiu trisu, byla pohyblivost skupiny B na úrovni 80 % po celých 60 sekund. Nejvyšší pohyblivost skupiny K byla na úrovni 50 % s poklesem na 10 % po 60 sekundách při aktivaci destilovanou vodou. Při použití aktivačního média trisu, byla pohyblivost spermií skupiny K na úrovni 60% po celých 60 sekund. Nejhorších výsledků dosáhla skupina T, kdy v destilované vodě byla nejvyšší pohyblivost na úrovni 40% s poklesem na 10% po 60 sekundách. U aktivačního média trisu byla pohyblivost skupiny T na úrovni 50 - 58 % po celých 60 sekund.

V porovnání s výsledky Huláka a kol. (2008a), který uvádí pohyblivost spermií štiky, odebraných metodou vytlačování bez použití katetru aktivovaných destilovanou vodou, na úrovni 60% po 10 sekundách od aktivace s poklesem pohyblivosti pod 10 % po 60 sekundách. U spermií aktivovaných močí uvádí nejvyšší pohyblivost 10 sekund od aktivace na úrovni 90% s poklesem pod 20% po 60 sekundách. U testikulárního spermatu aktivovaného destilovanou vodou uvádí 60% pohyblivost a u spermií aktivovaných močí udává pohyblivost na úrovni 100% po 10 sekundách s poklesem pod 20 % po 60 sekundách. Alavi a kol. (2009) uvádí nejvyšší procento pohyblivých spermií získaných metodou vytlačování bez použití katetru od 80 do 95% při osmolalitě od 125 do 235 mosmol.kg⁻¹, jeho výsledky odpovídají i našim výsledkům u skupiny bez katetru, kdy nejvyšší procento pohyblivých spermií bylo na úrovni 80 %.

U výsledku pohyblivosti spermií získaných metodou bez použití katetru (B), bylo dosaženo obdobných hodnot jako u Huláka a kol. (2008a). Co se týče pohyblivosti testikulárně odebraného spermatu, bylo v našem pokusu dosaženo výrazně nižších pohyblivostí mezi aktivačním roztokem trisu a močí. Tento vysoký rozdíl mohl být způsoben použitím odlišných aktivačních roztoků s odlišnou hodnotou osmolality a pH, kdy v této diplomové práci byl použit roztok trisu, v případě Huláka a kol.(2008a) byla k aktivaci použita moč s osmolalitou $67,9 \pm 35,5$ mosmol.kg⁻¹. Dalším možným důvodem mohlo být větší poškození spermií, zejména jejich bičíků, při cezení narušených varlat přes uhelon. Vliv na nižší motilitu mohlo mít i období výtěru, kdy náš pokus probíhal z počátku výtěrové sezony a sperma nemuselo být ještě dostatečně dozrálé a kvalitní.

U výsledků pohyblivosti Huláka a kol. (2008a) je vidět, že při aktivaci spermatu destilovanou vodou, je úbytek % pohyblivých spermií na stejném principu

jako v našem případě. U aktivace spermií močí je pokles pohyblivosti během 60 sekund opět výrazný. V rámci námi popisovaného experimentu nevykazuje sperma po aktivaci trisem téměř žádný pokles pohyblivosti po celých 60 sekund. Tyto rozdíly byly pravděpodobně způsobeny odlišnou osmolalitou a pH mezi aktivačním médiem trisu a močí.

5.3 Rychlost pohybu spermií- velocity

Rychlost pohybu (VCL) spermií byla v našem experimentu u spermatu skupiny B i T aktivovaného destilovanou vodou na úrovni $100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem na přibližně $35 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách, u skupiny K byla rychlost na úrovni $87 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem rychlosti na $26 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Po aktivaci roztokem trisu byla rychlost u všech tří skupin na úrovni $90 - 100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem na přibližně $60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách.

Hulák a kol (2008a) uvádí rychlost spermií odebraných bez katetru, aktivovaných destilovanou vodou na úrovni $160 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem pod $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Při aktivaci močí uvádí rychlost na úrovni $160 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem pod $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách. U testikulárního spermatu uvádí rychlost pohybu při aktivaci destilovanou vodou na úrovni $40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s téměř nulovou rychlostí po 60 sekundách. U aktivace močí uvádí rychlost na úrovni $80 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ s poklesem na $40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. V porovnání s našimi výsledky jsou zde výrazné rozdíly v počáteční ale i konečné rychlosti mezi oběma skupinami. V případě aktivace destilovanou vodou je v našem případě nižší počáteční rychlost kompenzována mírně vyšší konečnou rychlostí oproti výsledkům Huláka v případě testikulární skupiny i skupiny bez katetru. V této práci při aktivaci roztkem trisu, byla počáteční rychlost spermií nižší ale konečná rychlost byla výrazně vyšší u obou skupin spermatu než u Huláka. Rozdíly mezi rychlostmi v našem pokusu a pokusu Huláka a kol. (2008a), byly pravděpodobně způsobeny v případě vytlačovaného spermatu, různou kontaminací močí a tak i jeho různou kvalitou. V případě testikulárního spermatu mohly být rozdíly v rychlosti způsobeny odlišnou osmolalitou aktivačních médií a jejich pH, případně odlišným poškozením bičíků spermií včetně odlišné kvality spermatu v závislosti na termínu výtěru a s tím spojené zralosti. Co se týče ostatních parametrů rychlostí (VAP, VSL)

nebyl v rámci jednotlivých skupiny pozorován statisticky významný rozdíl mezi způsobem odběru. U všech pozorovaných parametrů kvality byl pozorován statisticky významný pokles jednotlivých ukazatelů po aktivaci destilovanou vodou než po aktivaci roztokem trisu. Tento jev byl pozorován i u výsledků Huláka a kol. (2008a), který uvádí statisticky průkazné rozdíly mezi použitými aktivačními médii (destilovaná voda, moč).

5.4 Linearita, Zvlnění pohybu spermií a frekvence úderů spermií

V této práci se linearita spermií při aktivaci destilovanou vodou pohybovala po 10 sekundách od aktivace u všech skupin na úrovni 80 %. Následně docházelo k poklesu u všech skupiny odběru spermatu na 55 - 60% po 60 sekundách od aktivace. Skupina T vykazovala nejnižší pokles a to lehce pod 65 % po 60 sekundách od aktivace. Při aktivaci roztokem trisu byla nejvyšší linearita u skupin K a B po celých 60 sekund na úrovni přibližně 83 %, skupina T vykazovala linearitu nižší, na úrovni 78 %. Výsledky linearity spermií štiky Bondarenka (2014) u spermatu získaného vytlačováním bez katetru aktivované roztokem 20 mM močoviny a 5 mM NaCl vykazovaly linearitu po 10 sekundách od aktivace na úrovni 65% s nárůstem na 75% po 45 sekundách. V našem případě při aktivaci roztokem trisu byla hodnota linearity vyšší o 10 % vyšší. Tento rozdíl mohl být způsoben použitím odlišného aktivačního média ale i kvalitou spermatu spojeného s obdobím výtěru.

Zvlnění pohybu spermií bylo na období úrovni jako linearita. Po aktivaci destilovanou vodou bylo zvlnění na úrovni 80% s poklesem na 60 % po 60 sekundách. Po aktivaci docházelo u všech skupin ke klesání poměru VAP a VCL.

Frekvence úderů spermií po aktivaci destilovanou vodou vykazovala vzrůstající tendenci z přibližně 8 $\text{hz}\cdot\text{s}^{-1}$ na 12 - 14 $\text{hz}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách. Nejvyšší nárůst frekvence vykazovalo testikulární sperma, statisticky významný rozdíl mezi skupinami však nebyl signifikantní. Po aktivaci roztokem trisu byla počáteční frekvence úderů spermií na úrovni 7 - 8 $\text{hz}\cdot\text{s}^{-1}$ s mírným nárůstem na 8 - 9 $\text{hz}\cdot\text{s}^{-1}$ po 60 sekundách. Nárůst frekvence úderů po aktivaci v destilované vodě podporuje výsledky Alaviho a kol. (2009), který uvádí že po aktivaci destilovanou vodou

dochází u spermii ke zkroucení bičíku a tak se snižuje i jeho efektivní délka, snižuje se délka vln na bičíku a s tím je spojený nárůst frekvence úderů ale i snížení procenta pohyblivých spermii a jejich rychlosti pohybu.

5.5 Osmolalita:

Osmolalita je jeden z hlavních faktorů spouštějící pohyblivost spermii. Například u kapra obecného a okouna říčního je pohyblivost inhibována vysokou osmolalitou semenné plazmy na úrovni 250 - 300 mosmol.kg⁻¹. U lososa atlantského (*Salmo salar*) je osmotický tlak na úrovni 230 - 245 mosmol.kg⁻¹. Oproti tomu osmolalita semenné plazmy u jeseterovitých dosahuje maximálně 100 mosmol.kg⁻¹. Díky snížení osmotického tlaku, zejména stykem s vodou při vypuštění spermii z varlat do okolního prostředí (vody), dochází k aktivaci pohybu spermii (Plouidy a Billard, 1982; Billard a Cosson, 1992).

K hodnocení kvality spermatu z hlediska kontaminace příměsmi ovlivňujícími jeho kvalitu jako je moč a krev, byla změřena osmolalita semenné plazmy. Osmolalita semenné plazmy byla v našem případě nejvyšší u skupiny testikulárního spermatu (T) a to na úrovni $300 \pm 5,71$ mosmol.kg⁻¹. U skupiny T není v případě opatrného odběru příliš velké riziko, že dojde ke kontaminaci spermatu krví, močí, vodou a jinými příměsmi snižujícími jeho kvalitu a osmolalitu. To potvrzuje i náš výsledek, kdy osmolalita semenné plazmy testikulárního spermatu nevykazovala u jednotlivých vzorků skupiny výraznější rozdíly v osmolalitě a odpovídala i výsledkům například Huláka a kol. (2008a) a Alaviho a kol. (2009). V případě skupiny K, u které byla naměřena průměrná hodnota osmolality na úrovni $288,5 \pm 23,05$ mosmol.kg⁻¹. Snížená hodnota osmolality skupiny K oproti testikulárnímu spermatu dokazuje, že při odběru katetrem i na vzdory šetrnému odběru se snahou nekontaminovat sperma močí, dochází ke smíchání spermatu a moči, a tak dochází k jeho kontaminaci a předčasné aktivaci. Další možnou příčinou snížené osmolality při použití katetru je kontaminace spermatu krví, ke které může dojít při zasunutí katetru do močopohlavních cest generační ryby. Vyšší směrodatná odchylka v rámci skupiny K - katetru napovídá i o různě velké kontaminaci moči nebo krve při odběru mezi jednotlivými vzorky, ale roli zde může

hrát i odlišná kvalita spermií v rámci dané ryby. Nejnižší úroveň osmolality a tak i nejvyšší kontaminace močí byla zjištěna u skupiny B - bez použití katetru. Průměrná hodnota osmolality skupiny B byla $255,6 \pm 39,26$ mosmol.kg⁻¹. Vysoká směrodatná odchylka vypovídá pravděpodobně o různě velké kontaminaci močí v rámci skupiny.

V experimentu Huláka a kol. (2008a), dosahovala osmolalita obdobných hodnot jako u našeho experimentu, kdy osmolalitu testikulárně odebraného spermatu uvádí v průměru 358 ± 77 mosmol.kg⁻¹ a osmolalitu spermatu odebraného bez katetru na úrovni 273 ± 21 mosmol.kg⁻¹. Z výsledků pohyblivosti a rychlosti pohybu spermií je jasné, že osmolalita má velký vliv na kvalitu spermií. V prostředí s nízkou osmolalitou spermie velmi rychle ztrácejí rychlost a rychle ubývá i počet pohyblivých spermií. Idelání osmolalitu pro nejvyšší rychlost pohybu a % pohyblivých spermií pak Alavi a kol. (2009) uvádí mezi 125 a 235 mosmol.kg⁻¹. Z tohoto důvodu mohla být v našem experimentu pohyblivost spermií skupiny K a B vyšší než u skupiny T.

Vliv osmolality aktivačního média na parametry pohybu spermií byl pozorován i v mé diplomové práci. U všech pozorovaných paramaterů kvality spermatu byl pozorován negativní efekt nízké osmotické úrovně aktivačního média. Destilovaná voda způsobovala ve všech pozorovaných případech výrazný a statisticky významný rozdíl v procentu pohyblivých spermií, rychlosti pohybu atd. oproti aktivaci roztokem trisu.

5.6 Oplozovací test

Oplozenost v našem experimentu byla nejvyšší při použití testikulárního spermatu (T) a to na úrovni $42,9 \pm 12,5$ % následované skupinou K s $28,67 \pm 12,1$ % a skupinou B s $26,83 \pm 19,14$ % oplozeností. Hampl (2015) a Bondarenko a kol. (2013) ve svých pracích uvádí oplozenost od 60 do 80%. V porovnání s našimi výsledky jsou zde patrné výrazné rozdíly v oplozenosti. Tyto odlišné oplozenosti mohly být způsobeny různými faktory. Jedním z důvodů mohl být v našem případě způsoben brzkým termínem výtěru generačních štik, a tak mohlo dojít k použití

ne příliš zralých kvalitních jiker a spermatu, díky kterým došlo ke snížené oplozenosti.

Vysoké směrodatné odchylky a tudíž i velké rozdíly oplozeností mezi jednotlivými vzorky u všech tří skupin této práce mohly být způsobeny právě různou kvalitou jiker, které byly odebrány od více jikernaček a následně smíchány. Ve vzorku jiker tak mohlo dojít ke smíchání nezralých, zralých ale i částečně přezralých jiker v různém poměru, který se pak mohl více či méně projevit v jednotlivých vzorcích. Nejvyšší rozdíly v oplozenosti (4,26 - 61,52 %) v rámci jedné skupiny byly nalezeny ve skupině B. Tyto rozdíly mohly být způsobeny také rozdílnou kvalitou odebraného spermatu, která mohla být způsobena různou kontaminací močí u jednotlivých vzorků. Dalším důvodem mohla být i nedostatečná kvalita jiker a spermií, neboť výtěr probíhal z počátku výtěrové sezony a tak gamety z některých generačních ryb nemusely být v dostatečném stadiu zralosti.

I přes to, že v hodnocení pohyblivosti vyšlo testikulární sperma (T) ze všech tří skupiny nejhůře, byla oplozenost jiker a líhivost larev mírně vyšší než u skupin B a K. Důvodem může být koncentrace spermií, která byla u testikulárního spermatu prokazatelně nejvyšší oproti ostatním skupinám. Větší počet spermií pravděpodobně zajistil kvalitnější oplození oproti ostatním skupinám i na vzdory nižší pohyblivosti, především procentu pohyblivých spermií. Co se týče skupin T, K a B, nebyl mezi skupinami pozorován statisticky průkazný rozdíl ve schopnosti oplození. Z tohoto důvodu bych i kvůli možnosti poškození ryby při použití katetru a nemožnosti eliminovat kontaminaci spermatu močí, k umělému oplození doporučil k rybě šetrnější klasický způsob vytlačovaného spermatu masáží břišní dutiny s okamžitým osemeněním jiker.

Oplozenost by bylo možné zlepšit použitím různých aktivačních roztoků, jak doporučuje Bondarenko a kol. (2013) nebo Hampl (2015). Mezi doporučované aktivační roztoky patří například Ringerův roztok, roztok močovininy nebo roztok chloridu sodného s trisem a glycinem. Všechny tyto roztoky jsou charakteristické vyšší osmolalitou. Díky těmto roztokům je možné zvýšit oplozenost až na 75 - 80 %. Cílem této práce však bylo porovnat oplození schopnost spermií odebraných různými metodami, z toho důvodu nebyl k aktivaci spermatu a jiker použit žádný ze zmiňovaných roztoků.

Inkubace jiker probíhala při průměrné teplotě $10,589 \pm 0,472$ °C, tato teplota odpovídá optimální teplotě inkubace, kterou doporučuje například Bondarenko a kol. (2013). Z tohoto důvodu nelze předpokládat, že nízká oplozenost a líhnivost byla způsobena nevhodnou inkubační teplotou.

Líhnivost larev byla v našem případě díky špatné oplozenosti poměrně nízká. Nejvyšší líhnivosti dosáhla skupina T s $31,51 \pm 6,5$ %. Líhnivost pro skupiny K a B byly lehce pod úrovní 20 %. Počátek líhnutí larev byl zaznamenán po uplynutí $115,6 \pm 5,5$ °D. Konec líhnutí larev byl zaznamenán po uplynutí $137 \pm 5,18$ °D při průměrné teplotě inkubace $10,59 \pm 0,47$ °C. Inkubace při této teplotě probíhala přibližně 13 dní. Tento výsledek odpovídá i výsledkům Bondarenka a kol. (2013) který uvádí inkubační dobu při 8 - 10 °C od 110 - 140 °D , což odpovídá 11 - 17,5 dnům.

Z hlediska kvalitní reprodukce je štika velmi problematický druh. U štiky je běžně velmi rozkolísaná oplozenost (10 - 80 %) a líhnivost v závislosti na roku, termínu výtěru, teplotních podmínkách atd. (Zvonař, ústní sdělení 2017).

6. ZÁVĚR

Výsledkem této práce je porovnání kvality spermatu odebíraného třemi odlišnými metodami. První metodou byl odběr vytlačovaného spermatu bez použití katetru (B). Druhou metodou byl odběr vytlačovaného spermatu pomocí katetru (K) s cílem eliminovat kontaminaci a předčasnou aktivaci spermatu močí. Posledním způsobem byl odběr testikulárního spermatu (T) z předem usmrceného mlíčka. Z výsledků hodnocení kvality spermatu bylo zjištěno, že použitím katetru nelze 100% eliminovat kontaminaci spermatu močí. Hlavním problémem je samotná anatomie vývodných cest štky. Použitím katetru lze generačního mlíčka poškodit a navíc kontaminovat sperma krví a tím omezit jeho použitelnost.

Nejvýznamějším parametrem kvality spermatu by měla být jeho schopnost oplození. V této práci nebyl mezi jednotlivými skupinami pozorován statisticky významný rozdíl v oplozenosti, z tohoto důvodu nelze jednoznačně označit nejkvalitnější metodu odběru. Vyšší oplozenosti oproti ostatním skupinám dosáhlo sperma testikulární, z tohoto důvodu se lze přiklonit k jeho použití. I přes nejnižší pohyblivost dosáhlo testikulární sperma nejvyšší oplozenosti v oplozovacím testu. Z tohoto důvodu lze usuzovat, že na oplozenost má spíše než vyšší pohyblivost vliv koncentrace spermií, která byla v tomto případě jednoznačně nejvyšší.

Co se týče kvality spermatu odebrané katetrem a bez katetru, nelze na základě vyrovnaných výsledků určit jednoznačně lepší metodu odběru. V hodnocení kvality spermatu nebylo ani v jednom případě u skupiny katetru pozorován pozitivní vliv katetru na kvalitu odebíraného spermatu. S přihlédnutím na možnost poškození ryby při použití katetru bych se já osobně přiklonil spíše k využití vytlačovaného spermatu klasickou metodou z důvodu větší šetrnosti ke generačním mlíčkům, ale i z důvodu jeho nejvyšší pohyblivosti oproti ostatním skupinám.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010. Aplikovaná hydrobiologie. FROV JU, Vodňany, 350 s.
- Aegerter, S., Jalabert, B., Bobe, J., 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and postovulatory ageing. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 377–385.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Sperm motility in fishes. I. Effects of pH and temperature. *Cell Biol Int* 2005;29:101–10.
- Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M. Fish spermatology: implications for aquaculture management. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editors. *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science Ltd.; 2007. p. 397–460.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2009. Morfologie spermií, složení seminální plazmy, motilita a parametry zvlnění bičíku spermie u štiky obecné (*Esox lucius*). *Bulletin VÚRH Vodňany* 45: 3–9.
- Babiak, I.; Glogowski, J.; Luczynski, M. J.; Luczynski, M., 1998: Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquacult. Res.* 28, 191–197.
- Baruš V., Oliva, O. 1995. Míhulovci a ryby. Academia., Praha. (1): 559- 576.
- Berka, R., Hamáčková, J., 1980: Chov štiky a candáta. Studijní zpráva, Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Živočišná výroba 2, 79s.
- Billard, R., 1983: Le brochet: gestion dans le milieu naturel et élevage. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, FR, 371 pp.
- Billard, R., Cosson, M. P., 1992 Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 261(2), 122-131.
- Billard, R., 1996. Reproduction of Pike: gametogenesis, gamete biology and early development. In: Craig, J.E. (Ed.), *Pike – biology and exploitation*. Chapman and Hall, London, UK, 13–67.
- Bobe, J., Labbe, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 535–548.

- Bohlen, J., 2003. Temperature and oxygen requirements of early life stages of the endangered spined loach, *Cobitis taenia* L. (Teleostei, Cobitidae) with implications for the management of natural populations. Arch. Hydrobiol. 157, 2, 195–212.
- Bondarenko, V., Drozd, B., Policar, T., 2015b. Effect of water temperature on egg incubation time and quality of newly hatched larvae of northern pike (*Esox lucius* L., 1758). Journal of Applied Ichthyology, 31 (Suppl. 2): 45 – 50.
- Bondarenko, V., Křišťan, J., Švinger, V., Policar, T., 2014. Reprodukce a odchov rychleného plůdku štiky obecné (*Esox lucius*). Edice Metodik (Certifikovaná metodika), FROV JU Vodňany 144: 54s.
- Bondarenko, V., Podhorec, P., Svinger, V., Policar, T., 2015a. Evaluation of different treatments for induction of ovulation in Northern pike (*Esox lucius* L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 15: 581 – 587.
- Bondarenko, V., Podhorec, P., Švinger, V., Policar, T., 2012. Effect of different spawning time on fertilization, hatching rate and embryo quality in northern pike, *Esox lucius* (L.). In: Kucharczyk, D. (Ed.), Domestication in Finfish Aquaculture, Book of Abstracts, October 23–25, Olsztyn, Poland, 68.
- Bondarenko, V., Podhorec, P., Švinger, V., Policar, T., 2013. Evaluation of hormonal preparations for stimulation of ovulation in northern pike (*Esox lucius* L.). In: Pšenička, M., Němcová, I., Dvořáková, Z., Kovaříková, K. (Eds), Diversification in Inland Finfish Aquaculture II (DIFA II), Book of Abstracts, September 24–26, Vodnany, Czech Republic, 102.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., Ciereszko, A., 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. Theriogenology, 80(7), 758-765.
- Boryshpolets, S., Cosson, J., Bondarenko, V., Gillies, E., Rodina, M., Dzyuba, B., Linhart, O., 2013a. Different swimming behaviors of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa close to solid and free surfaces. Theriogenology 79, 81–86.
- Calderon, A. E. G., 1955: Acclimatation du brochet en Espagne. Vehr. int. Ver. theor. angew. Limnol., 12 : 536 - 542.
- Cejko, B. I., Sarosiek, B., Krejszeff, S., Judycka, S., Szczepkowski, M., Szczepkowska, B., & Kowalski, R. K., 2016. Effects of different stripping methods of female and activation medium on fertilization success in northern pike (*Esox lucius*). Czech Journal of Animal Science, 61(10), 481-486.

- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Nynca, J., Liszewska, E., Karol, H., Dobosz, S., 2013. The use of concentrated extenders to improve the efficiency of cryopreservation in whitefish spermatozoa, *Aquaculture* 408 - 409, 30-33.
- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Sobocki, M., Hliwa, P., Kuźmiński, H., Dobosz, S., Slowińska, M., Nynca, J., 2008. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) semen from Lake Lebsko, *Fundam. Appl. Limnol.* 173, 59-65.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Suquet, M., 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, editor. *The male gamete: from basic to clinical applications*. Vienna: Cache Rive Press. p. 161–86.
- Cosson, J., Groison, A.L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard, R., 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 460-486.
- Craig, J., 2008: A short review of pike ecology - *Hydrobiologia* 601: 5 - 16.
- Craig, J., 2013. *Pike: biology and exploitation* (Vol. 19). Springer Science & Business Media.
- Crossman, E.J., 1996. Taxonomy and distribution. In: Craig, J.E. (Ed.), *Pike - biology and exploitation*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 1–11.
- Čítek J., Krupauer V., Kubů F., 1998: *Rybníkářství*. 3. vyd. Informatorium, Praha, 309 s.
- Dietrich, G. J., Nynca, J., Szczepkowski, M., Dobosz, S., Szczepkowska, B., & Ciereszko, A., 2016. The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture*, 464, 60-64.
- Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Slowinska, M., Dobosz, S., Kuzminski, H., Ciereszko, A., 2007. Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid. *Aquaculture* 273: 748–751.
- Drozd, B., Kouril, J., Blaha, M., Hamackova, J., 2009. Effect of temperature on early life history in weatherfish, *Misgurnus fossilis* (L. 1758). *Knowl. Managt. Aquatic. Ecosyst.* 392, 04–17.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha: 164 - 166.

- Dubský, K., 1998. Chov štiky. In: Dubský, K. (Ed.), *Základy chovu vedlejších druhů ryb*. Institut výchovy a vzdělávání MZe, Praha, s. 13–15.
- Dvořák, P., Pyszko, M., Velíšek, J., Dořáková Líšková, Z., Andreji, J., 2014: *Anatomie a fyziologie ryb*. s. 143 -153.
- Dyk, V., 1946. Příspěvky k biologii střevle. Sb. ČAZ, 19: 138 - 140.
- Dzyuba, B., Bondarenko, O., Fedorov, P., Gazo, I., Prokopchuk, G., & Cosson, J., 2017. Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. *Aquaculture*, 472, 60-72
- Falkowski, S., Wolos, A. 2007 – Whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), in the fisheries management of Lake Goldopiwo (Northeastern Poland) from 1950 to 2005 – *Arch. Pol. Fish.* 15: 103-116.
- Farrell, J. M., J. V. Mead & B. A. Murry. 2006: Protracted spawning of St Lawrence River northern pike (*Esox lucius*): simulated effects on survival, growth, and production. *Ecology of Freshwater Fish* 15: 169-179
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department), 2013. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics: Service <<http://www.fao.org/fishery/statistics/globalaquaculture-production/query/en>> Navštíveno 12. 9 2017.
- Fortunatova, K. R., 1961. Metodika izučeniya pitaniya chišených ryb. *Rokovodstvo*. Izd. AN SSSR Moskva, pp. 137- 187
- Füllner, G., Pfeifer, M., Langer, N., 2007. *Karpfenteichwirtschaft, Bewirtschaftung von Karpenteichen, Gute fachliche Praxis*. Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Dresden, Germany, 129 s.
- Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Ciereszko, A., 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquac. Res.* 31, 289–296.
- Hamáčková, J., 1987. Chov štiky. *Oborová norma 46 6836*. ÚNM, Praha, 1987, 12 s.
- Hampl, J., 2015, *Optimalizace umělé inkubace jiker a embryí u štiky obecné (Esox lucius) v kontrolovaných podmínkách*.
- Hartman, P., Regenda, J., 2014. *Praktika v rybníkářství*. Vyd. 1. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 375 s. ISBN 978-80-7514-009-8.

- Hochleithner, M., 2004. Hechte (Biologie und Aquakultur). Aquatech Publications, Kitzbühel, Austria, 152 pp.
- Hochman, L., 1964. Plodnost a stav vyživenosti štik z rybníků. Sborník VŠZ v Brně, 557–567.
- Holčík, J., 1970. The Klíčava reservoir (an ichthyological study). Biol. práce SAV, Bratislava, 15 (3): 1 - 94.
- Holwill, M.E., Miles, C.A., 1971. Hydrodynamic analysis of non-uniform flagellar undulations. Theor. Biol. 31, 25–42.
- Hubenova, T., Zaikov, A., 2007. Investigation on fecundity, follicles and free embryo size of pond-reared pike (*Esox lucius* L.) of different age and size. Aquaculture International 15: 235–240.
- Hulák, M., Rodina, M., Linhart O., 2008b. Charakteristika vytřeného a testikulárního spermatu štiky obecné (*Esox lucius* L.): motilita a rychlost spermií. Bulletin VÚRH Vodňany 44: 3–9.
- Hulák, M., Rodina, M., Linhart, O., 2008a. Characteristics of stripped and testicular Northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. Aquatic Living Resources 21: 207–212.
- Jacobsen, L., Skov, C., Koed, A., Berg, S., 2007 : Short-term salinity tolerance of northern pike, *Esox lucius*, fry, related to temperature and size – Fish. Manag. Ecol. 14: 303-308.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., 1975. Plodnost štiky obecné (*Esox lucius*) z rybníčního chovu. Živočišná Výroba 20 (11): 841–849
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Svobodová, Z., 1976. Exteriérové a kondiční ukazatele štiky obecné (*Esox lucius* L.) z rybníčního chovu a v předvýtěrovém období. Bulletin VÚRH Vodňany 12 (3): 3–8.
- Kratochvíl, M., 2012. Výlov tržních ryb u členů RS v roce 2011 a využití produkce ryb v ČR v letech 1990–2011. Zpráva Rybářského sdružení České republiky, 31 s.
- Křišťan, J., Bouchet, D., Polícar, T., 2013. Reproductive characteristics and optimization of egg fertilization in Northern pike (*Esox lucius* L.). In: Aquaculture Europe 2013, USB of Abstracts, August 10–12, Trondheim, Norway, p. 134.
- Kucska, B.; Muller, T.; Sári, J.; Bodis, M.; Bercsenyi, M., 2005: Successful growth of pike fingerlings (*Esox lucius*, L.) on pellet at artificial condition. Aquaculture 246, 227–230.

- Kupren, K., Mamcarz, A., Kucharczyk, D., 2011. Effect of variable and constant thermal conditions on embryonic and early larval development of fish the genus *Leuciscus* (*Cyprinidae*, *Teleostei*). *Czech. J. Anim. Sci.* 56, 70–80.
- Lahnsteiner, F., Patzner, RA. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward R, Rafiee G, editors. *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science Ltd.; 2008 . p. 1–61.
- Lahnsteiner, F., Weismann, t, Partner, R. A., 1998: An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the northern pike (*Esox lucius*). *Aquac. Res.* 29: 341- 347
- Lahnsteiner, F., 2000: Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the northern pike. *Aquacult. Res.* 31, 245–258
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbányi, B., & Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54(9), 1477-1498.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., 2004. Optimization of artificial propagation in European catfish *Silurus glanis* L.. *Aquaculture*; 235:619–32.
- Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J., 2003, Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). *J. Appl. Ichthyol.* 19, 177–181
- Linhart, O., 1984. Hodnocení spermatu štiky obecné a sumce velkého. *Bulletin VÚRH Vodňany* 20: 22–330.
- Lusk, S., Baruš V., Vostradovský, J., 1992: *Ryby v našich vodách*. 2. vydání. Nakladatelství ČSAV Academia, Praha, 248 s.
- Lusk, S., Krčál, J., 1982. *Štika obecná*. Vyd. Naše vojsko, Praha, 54 s.
- Mann, R.H.K., 1996. Fisheries and economics. In: Craig, J.E. (Ed.), *Pike – biology and exploitation*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 219–241
- Nynca, J., Dietrich, G.J., Fopp-Bayat, D., Dietrich, M.A., Slowinska, M., Liszewska, E., Karol, H., Martyniak, A., Giereszko, A., 2012. Wuality parameters of fresh and cryopreserved whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 934 - 940.
- Paukert, C.P., Stancill, W., DeBates, T. J., Willis, D. W., 2003 – Predatory effects of northern pike and largemouth bass: bioenergetic modeling and ten years of fish community sampling – *J. Freshwater Ecol.* 18: 13-24.

- Plouidy, M. G., Billard, R. (1982). The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Reproductive Physiology of Fish*, 134.
- Polícar, T., 2012a. Ověření technologie zaručující kvalitní a vyrovnanou produkci násadového materiálu štiky obecné. Technická zpráva z pilotního projektu č. CZ.1.25/3.4.00/11.00397, 37 s.
- Polícar, T., 2012b. Vývoj technologie potravní adaptace larev štiky obecné na peletované krmivo a intenzivní chov v RAS. Technická zpráva z pilotního projektu č. CZ.1.25/3.1.00/11.00271, 25 s.
- Poupard, G.P., Paxion, C., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1998, Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture* 160, 317–328.11
- Randák, T., 2013: Rybářství ve volných vodách. 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 434 s.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004, Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca L.*). *Aquac. Int* 12, 119–131.
- Rodina, M., Polícar, T., Linhart, O., Rouget, C., 2008. Sperm motility and fertilizing ability of frozen-thawed spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Applied Ichthyology* 24: 438–442.
- Samarin, A.M., Blecha, M., Bytyutskyy, D., Polícar, T., 2015a. Post-ovulatory oocyte ageing in pikeperch (*Sander lucioperca L.*) and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Turk. J.Fish. Aquat. Sci.* 15, 435–441.
- Szabó, T., 2003. Ovulation induction in northern pike *Esox lucius L.* Using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary: *Aquaculture Research* 34: 479 -486.
- Szczepkowski, M., 2009. Impact of selected abiotic and biotic factors on the results of rearing juvenile stages of northern pike *Esox lucius L.* in recirculating systems. *Arch. Pol. Fish.* 17,107–147.
- Švinger, V.W., Bondarenko, V., Kallert, D.M., Polícar, T., 2012. Vliv dvou metod hypofyzace na kvalitu jiker u štiky obecné (*Esox lucius*). *Bulletin VÚRH Vodňany* 49: 21–33.

- Vostradovský, J., 1971. Potrava štiky obecné (*Esox lucius* L.) v údolní nádrži Lipno. Práce VÚRH Vodňany, 1971 (9): 159 - 189.
- Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Slowinska, M., Dobosz, S., Kuzminski, H., Ciereszko, A., 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Aquaculture 270: 259–264.
- Zalachowski, W., 2000. Northern pike. In: Freshwater fish of Poland (Ed.) M. Brylińska, Wyd. PWN, Warsaw: 362-368.
- Zhang, J.J., Li, S.Z., Tulake, K., Yan, Q.P., Li, W.J., 2011. The effects of extenders and sperm-egg ratios on fertilizing ability of crypreserved testicular sperm of northern pike (*esox lucius* L.). J. Appl. Ichthyol. 22, 201-204.
- Zurbuch, P.E., 1965. A structure for easy fish recovery during drainage of an impoundment. The Progressive Fish-Culturist, 27, 237–238.
- Ženíšková, H., Gall, V., 2011. Situační a výhledová zpráva, Ryby. Ministerstvo zemědělství ČR, 45 s.

8. ABSTRAKT

Cílem této práce bylo porovnat kvalitu spermatu štiky obecné odebraného 3 způsoby. První metodou bylo klasicky vytlačované sperma masáží břišní dutiny bez katetru (B). Druhým způsobem byl odběr vytlačovaného spermatu s využitím katetru (K) zasunutého do urogenitální papily mlíčka s cílem eliminovat kontaminaci spermatu močí. Posledním metodou byl odběr testikulárního spermatu (T).

Signifikatně nejvyšší koncentrace spermií bylo dosaženo u skupiny T ($33,041 \pm 7,453 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$) oproti K ($20,47 \pm 4,42 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$) a B ($18,21 \pm 3,84 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$).

Signifikatně vyšší osmolality semenné plazmy bylo dosaženo u skupiny T ($307 \pm 5,7 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) oproti skupině K ($288 \pm 23 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) a B ($255 \pm 39 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Nejvyšší pohyblivost po aktivaci destilovanou vodou byla pozorována po 10 sekundách od aktivace u všech tří skupin odběru spermatu. Nejvyšší pohyblivost byla u skupiny B ($68,6 \pm 11,5\%$ s poklesem na $24,01 \pm 14,44\%$ po 60 sekundách) se signifikatně nejvyšší pohyblivostí oproti skupinám K ($50,9 \pm 21,1 - 13 \pm 4,89$ po 60 sekundách %) a T ($37,17 \pm 16,91 - 12,86 \pm 1,81$ po 60 sekundách %).

V aktivačním médiu trisu byla nejvyšší pohyblivost pozorována mezi 30 a 40 sekundami od aktivace u všech tří skupin odběru. Nejvyšší pohyblivost byla u skupiny B ($81,86 \pm 7,28\%$) se signifikantním rozdílem oproti skupině K ($61,84 \pm 20\%$) a skupině T ($58,41 \pm 10,98\%$). U všech pozorovaných parametrů byl signifikantní rozdíl mezi použitým aktivačním médiem (destilovaná voda a roztok trisu). V této práci bylo dále zjištěno, že použitím katetru se nelze 100% vyvarovat kontaminaci spermatu močí, zejména díky anatomii vývodných cest štiky.

Klíčová slova: Štika obecná, umělá reprodukce, odběr spermatu, kvalita spermatu, CASA analýza, pohyblivost spermií, rychlost pohybu spermií, koncentrace spermií, katetr, osmolalita semenné plazmy, oplozenost jiker.

9. ABSTRACT

The aim of this study was to compare quality of northern pike sperm collected by three different methods. First method was collecting stripped sperm by abdominal massage of belly without using catheter (B). Second method was collecting stripped sperm with catheter (K) which was inserted into the urogenital papilla of the male to prevent sperm contamination by urine. The last method was collecting of testicular sperm (T).

Significantly higher spermatozoa concentrations was observed in T sperm ($33,041 \pm 7,453.10^9.ml^{-1}$) compared with K sperm ($20,47 \pm 4,42.10^9.ml^{-1}$) and B sperm ($21 \pm 3,84.10^9.ml^{-1}$).

Significantly higher osmolality of seminal fluid was observed in T sperm ($307 \pm 5,7 mosmol.kg^{-1}$) compared with K sperm ($288 \pm 23 mosmol.kg^{-1}$) and B sperm ($255 \pm 39 mosmol.kg^{-1}$).

All three groups of sperm collecting shows the highest motility after 10 second after activation in distilled water. Significantly higher motility was observed in B sperm ($68,6 \pm 11,5\%$ decreased to $24,01 \pm 14,44 \%$ after 60 seconds) than in K sperm ($50,9 \pm 21,1 - 13 \pm 4,89 \%$ after 60 seconds) and T sperm ($37,17 \pm 16,91 - 12,86 \pm 1,81 \%$ after 60 seconds).

All three groups of sperm collection shows the highest motility between 30 and 40 second after activation by tris solution. Significantly highest motility was observed in B sperm ($81,86 \pm 7,28 \%$) compared to K sperm ($61,84 \pm 20 \%$) and T sperm ($58,41 \pm 10,98 \%$). For all observed parameters, there was a significant difference between activation medium (distilled water, tris solution). In this work was further found that using of catheter can not 100 % prevent contamination of sperm by urine, mainly because of the pike anatomy.

Key words: Northern pike, artificial reproduction, sperm collecting, sperm quality, CASA analyse, spermatozoa motility, spermatozoa velocity, spermatozoa concentration, catheter, osmolality of seminal fluid, egg fertilization.