

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

Diplomová práce

Indukce triploidie u candáta obecného (*Sander lucioperca*)

Autor : Bc. Martin Růžek

Vedoucí diplomové práce : Ing. Miroslav Blecha, Ph.D.

Konzultant diplomové práce : doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.

Studijní program a obor : Zemědělská specializace, rybářství
a ochrana vod

Forma studia : Prezenční

Ročník studia : II.

České Budějovice, 2018

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích

Podpis studenta

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat svému vedoucímu Ing. Miroslavu Blechovi Ph.D. za poskytnutou pomoc, metodické vedení, rady a cenné připomínky, které mi s ochotou poskytoval v průběhu zpracování této diplomové práce. Mé velké díky zároveň patří mému konzultantovi doc. Ing. Tomášovi Polícarovi Ph.D. za pomoc v průběhu celého experimentu.

Rovněž bych chtěl touto cestou poděkovat svým rodičům a přítelkyni za podporu v průběhu studia a psaní této práce.

Na závěr bych chtěl jmenovitě poděkovat panu Bc. Martinu Hubálkovi za obětavou výpomoc v laboratoři.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2016/2017

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

Jméno a příjmení: **Bc. Martin RŮŽEK**
Osobní číslo: **V16N011P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Indukce triploidie u candáta obecného (*Sander lucioperca*)**
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 :

Za triploidní jsou označováni jedinci se somatickými buňkami, které obsahují tři sady chromosomů. Rozdíl oproti standardnímu počtu chromosomů (2 sady) může být způsoben přirozenou cestou nebo může být uměle vyvolán. Důvodem pro přirozený výskyt ploidních anomálií může být například přezrání jiker v předvýtěrovém období. U ryb je většinou polyploidního stavu docíleno za pomoci šoku, který zabrání odpojení druhého pólového tělíška v průběhu meiózy, aplikovaného krátce po aktivaci pohlavních buněk. Nejběžněji jsou pro umělou indukci polyploidie používány teplotní a tlakové šoky. Méně často jsou pak využívány šoky chemické, které jsou založeny na přerušení funkce dělicího vřeténka za pomoci cytochalasinu B nebo 6-dimethylaminopurinu. U okounovitých ryb byla v minulosti uměle indukována triploidie s více či méně uspokojivými výsledky.

Cílem této bakalářské práce bude za pomoci teplotního šoku uměle navodit triploidii u candáta obecného a pokusit se nalézt neefektivnější možnou kombinaci začátku iniciace, intenzity a délky trvání teplotního šoku na indukci triploidie u larev candáta. Dále bude sledován vliv jednotlivých šoků na líhivost larev a výskyt deformit u larev. Ploidní úroveň larev bude stanovena za pomoci průtokové cytometrie.

Rozsah grafických prací: dle potřeby (do 20 stran)

Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P., 1993. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture* 113: 301-312.

Flajšhans, M., Kohlmann, K., Rab, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to postovulatory ageing *in vitro* and *in vivo*. *J. Fish. Biol.* 71, 868-876.

Garcia-Abiado, M. A. R., Lynch, W. E., Dabrowski, K. & Hartman, T., 2001. Use of thermal and pressure shocks to induce triploid hybrid saugeyes. *North American Journal of Aquaculture* 63, pp 83-91.

Legatt, R.A. and Iwama, G.K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 237-246.

Malison, J. A., Held, J. A., Weil, L. S., Kayes, T. B. & Thorgaard, G. H., 2001. Manipulation of Ploidy in Walleyes by Heat Shock and Hydrostatic Pressure Shock. *North American Journal of Aquaculture* 63, pp 17-24.

Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries* 9, pp 67-78.

Piferrer, F.; Beaumont, A.; Falguiere, J. C.; Flajšhans, M.; Haffray, P. & Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, pp 125-156.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Blecha, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Tomáš Policar, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 11. prosince 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 4. května 2018


v. z. prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 11. prosince 2016

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. HLAVNÍ STAŤ	10
2.1. Polyploidie a polyploidizace	10
2.2. Přírozená polyploidizace	10
2.2.1. Autopolyploidie	11
2.2.2. Alopolyloidie	12
2.3. Umělá indukce polyploidie	12
2.3.1. Mitóza	12
2.3.2. Meióza	13
2.3.3. Triploidizace	13
2.3.4. Tetraploidizace	14
2.4. Druhy šoků používané při umělé polyploidizaci ryb	16
2.4.1. Mechanické šoky	16
2.4.2. Chemické šoky	16
2.4.3. Fyzikální šoky	17
2.4.3.1. Elektrofúze	17
2.4.3.2. Tlakové šoky	17
2.4.4. Teplotní šoky	18
2.4.4.1. Chladový šok	18
2.4.4.2. Teplý šok	18
2.5. Faktory ovlivňující efektivitu umělé polyploidizace	19
2.5.1. Začátek šoku	19
2.5.2. Intenzita šoku	19
2.5.3. Expoziční doba	20
2.6. Polyploidie v intenzivní akvakultuře	20
2.6.1. Výhody chovu triploidních ryb	20
2.6.2. Nevýhody produkce a chovu triploidních ryb	21
2.7. Metody určení ploidní úrovně	21
2.7.1. Přímé metody	21
2.7.1.1. Stanovení karyotypu	21
2.7.1.2. Kvantifikace obarvených oblastí organizátoru jadérka (NOR)	22
2.7.1.3. Průtoková cytometrie	22
2.7.1.4. Denzitometrie	23

2.7.2. Nepřímé metody	23
2.7.2.1. Coulterova metoda	23
2.7.2.2. Měření geometrických charakteristik erytrocytů	23
2.7.2.3. Morfologické rozdíly mezi triploidy a diploidy	23
2.8. Triploidie u okounovitých druhů ryb	24
2.9. Candát obecný (<i>Sander lucioperca</i>)	25
2.9.1. Současná situace	25
2.9.2. Zařazení, popis a biologie candáta obecného	25
3. MATERIÁL A METODIKA	29
3.1. Místo pokusu	29
3.2. Generační ryby, příprava generačních ryb na umělý výtěr a umělý výtěr jiker a spermatu	29
3.3. Příprava ledové lázně	31
3.4. Experimentální skupiny, oplodnění a aktivace gamet	31
3.5. Inkubace jiker, péče i jikry v průběhu inkubace, kulení larev a sledování malformací u čerstvě vykulených larev	32
3.6. Měření ploidní úrovně	33
3.7. Statistické vyhodnocení dat	35
4. VÝSLEDKY	36
4.1. Délka inkubační doby a líhivost	36
4.1.1. Délka inkubační doby a líhivost jiker po 20minutové expozici	36
4.1.2. Líhivost po 40minutové expozici	36
4.2. Výskyt malformovaných larev	37
4.2.1. Výskyt malformovaných larev po 20minutové expozici	37
4.2.2. Výskyt malformovaných larev po 40minutové expozici	38
4.3. Výskyt triploidních larev	39
4.3.1. Výskyt triploidů po 20minutové expozici	39
4.3.2. Výskyt triploidů po 40minutové expozici	40
4.4. Neobvyklé ploidní úrovně	42
5. DISKUZE	44
6. ZÁVĚR	48
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
8. ABSTRAKT	57
9. ABSTRACT	58

1. ÚVOD

Za triploidní organismy lze označovat takové, které mají ve svých buňkách tři sady chromozomů. Triploidní stav může u ryb vznikat zcela přirozeně (např. při přezránání jiker), avšak pro účely akvakultury je tento stav indukovan záměrně (Leggatt and Iwama, 2003). Smyslem záměrné produkce triploidních ryb je skutečnost, že tři sady chromozomů vedou k částečné nebo úplné sterilitě, která se poté projevuje rychlejším růstem a vyšší kvalitou masa, čímž se významně posiluje ekonomika chovu (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013). Nejpoužívanější možností pro záměrnou indukci triploidního stavu je vystavení aktivovaných jiker takzvanému šoku (teplotní nebo tlakový), který u jiker způsobí zadržetí druhého pólóvého tělíška. Méně používanou variantou je křížení tetraploidních ryb ($4n$) s rybami diploidními ($2n$) (Piferrer a kol., 2009). Triploidizace našla své uplatnění nejen pro produkci sterilních jedinců, ale je zároveň využívána pro obnovení ploidní úrovně při produkci celosamičích obsádek pomocí gynogeneze (Peruzzi a Chatain, 2000; Felip a kol., 2001).

V současné době je snaha omezit znečištění pocházející z intenzivní akvakultury, a proto se chov ryb začíná posouvat do recirkulačních akvakulturních systémů (RAS). Pro zvýšení efektivity provozu těchto systémů se do chovů zavádí ty druhy ryb, které vynikají rychlým růstem, vysokou kvalitou svaloviny a vysokou tržní hodnotou (Zhang a kol., 2011). V tomto ohledu lze označit okounovité druhy ryb za ideální kandidáty.

Mezi evropsky nejvýznamnější okounovité druhy ryb chované v akvakultuře patří i candát obecný (*Sander lucioperca*). Důvodem zájmu o jeho chov byla nejen jeho kvalitní svalovina, ale i skutečnost, že za posledních 30-40 let se divoké populace vlivem intenzivního lovu snížily o více než 50 % (Policar a kol., 2013). Do podmínek recirkulačního akvakulturního systému byl candát poprvé převeden před 10-15 lety, přičemž v budoucnu lze očekávat nárůst jeho produkce (Molnár a kol., 2004). V České republice je jeho chov prováděn především v kombinaci rybníka a RAS.

Triploidizace byla u okounovitých druhů ryb již experimentálně testována u okouna žlutého (*Perca flavescens*; Malison a kol., 1993), okouna říčního (*Perca fluviatilis*; Rougeot a kol., 2003), candáta severoamerického (*Sander vitreum*; Malison a Garcia-Abiado, 1996) a jeho hybrida s candátem kanadským (*S.vitreum* x *S. canadensis*; Garcia-Abiado a kol., 2001). Výzkum triploidizace candáta obecného je teprve na svém prvopočátku a z toho důvodu je k dispozici pouze omezené množství informací. Cílem

této studie je otestovat možnost triploidizace candáta obecného za pomoci chladového šoku, pokusit se nalézt nejefektivnější kombinaci pro začátek aplikace šoku, intenzity a délky trvání teplotního šoku. Zároveň bude posouzen vliv šoku na celkovou líhivost jiker, výskyt tělesných deformit a ploidní úroveň larev. Ploidní úroveň larev bude následně ověřována za pomoci průtokové cytometrie.

2. HLAVNÍ STAŤ

2.1. Polyploidie a polyploidizace

Na začátek je velmi důležité říci, že řízená polyploidie patří do skupiny chromozomových manipulací (Arai, 2000) a takto vzniklí jedinci nejsou a ani nemohou být označováni za GMO (Geneticky Modifikovaný Organismus; Piferrer a kol., 2009). V principu se jedná o stav, ve kterém dojde v buňkách ke zmnožení chromozomových sad nad jejich přirozenou ploidní úroveň (Leggatt a Iwama, 2003). Takovéto organismy poté označujeme jako polyploidi nebo také polyploidní. Podle počtu chromozomových sad je k nim přiřazen prefix např. pro 3 (tri), 4 (tetra), 5 (penta) a další (Comai, 2005).

Hegarty a Hiscock (2007) uvádějí, že přirozená polyploidie byla jedním z nástrojů evoluční speciace živočichů a rostlin, díky které vznikla jejich druhová rozmanitost. Konkrétně u ryb došlo v průběhu jejich evoluce pravděpodobně hned k několika polyploidizačním událostem (Le Comber a Smith, 2004). Polyploidie ale není doménou pouze ryb. Její výskyt byl zjištěn také u měkkýšů, plazů, obojživelníků a dokonce, velmi vzácně, u některých savců (Gallardo a kol., 1999). Známa je rovněž u rostlin, kde je hojně využívána při šlechtění různých zemědělských plodin (Piferrer a kol., 2009).

Polyploidní stav může vznikat spontánně přirozenou cestou, nebo může být navozen uměle. Polyploidii jako takovou lze pak rozdělit do dvou základních forem – autopolyploidie a alopolyploidie (Flajšhans a kol., 2013).

2.2. Přirozená polyploidizace

Se spontánní (přirozenou) polyploidizací je možné se setkat u značného množství rybích druhů (Benfey, 1989). Ráb a kol. (2007) potvrzují výskyt triploidního jedince jelce proudníka (*Leuciscus leuciscus*) z řeky Dyje. Při podobném průzkumu zjistili autoři Flajšhans a Ráb (1987) také přítomnost triploidního pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a lína obecného (*Tinca tinca*). Japonští vědci Zhang a Arai (1999) popisují přítomnost triploidních piskořů (*Misgurnus anguillicaudatus*) v několika lokalitách tamních řek. Výskyt přirozeně triploidních nebo tetraploidních jedinců této čeledi na území Evropy popisují Flajšhans a kol. (2013). Různé polyploidní stavy byly rovněž nalezeny např. u iberie ouklejovité (*Leuciscus alburnoides*). V Číně byli ve volných vodách nalezeni triploidní i tetraploidní jedinci karase stříbřitého (*Carassius auratus*; Xiao a kol., 2011). U jeseterů je například možné se setkat až se čtyřmi různými ploidními úrovněmi (Carmona a kol., 2008). Polyploidní jedinci se také vyskytují u celé řady

akvarijských ryb. Rasch a kol. (1982) popsali výskyt spontánně triploidních živorodek (*Poecilia formosa*). Maistro a kol. (2004) objevili triploidní jedince tetery z rodu *Astyanax*. Triploidní i tetraploidní jedinci byli popsáni také u akvarijských sumců z čeledi *Heteropneustidae* (Flajšhans a kol., 2013).

Polyploidní jedinci mohou spontánně vznikat hned několika způsoby, které jsou popsány v následujících kapitolách.

2.2.1. Autopolyploidie

Při autopolyploidii dochází ke zmnožení chromozomových sad, a to při reprodukci jedinců stejného druhu. Příklady vzniku autopolyploidie popsali Flajšhans a kol. (2008) a Piferrer a kol. (2009). Podle obou autorů lze vznik autopolyploidie shrnout do čtyř následujících situací.

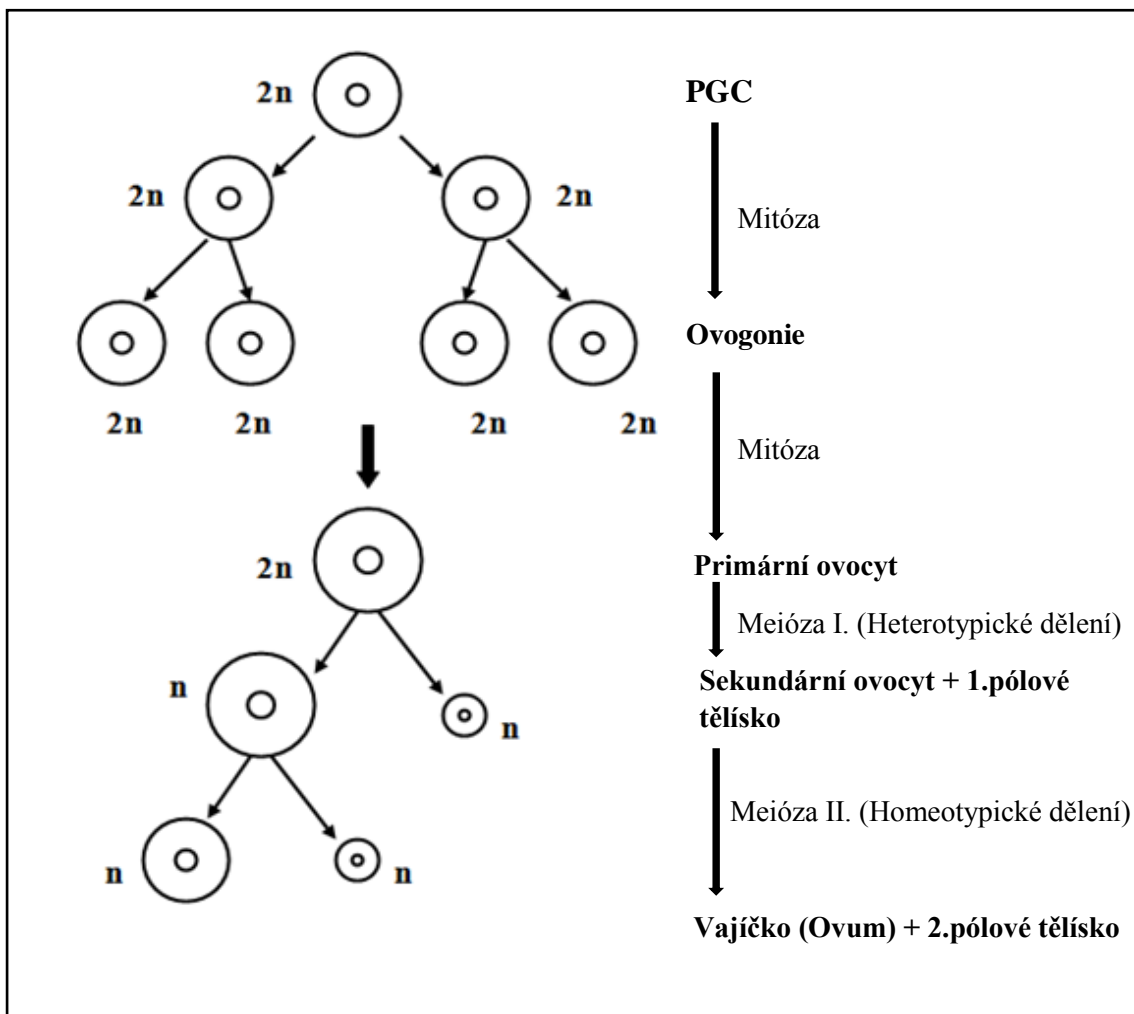
1. **Porucha gametogeneze** – při samotné gametogenezi může dojít k potlačení první či druhé fáze meiotického dělení, popřípadě selhání rozchodu mitotických chromozomů.
2. **Přezrání ovocytů a jiker** – v případě přezrání ovocytů či jiker dochází ke změnám cytoskeletální organizace buňky, které mohou vést ke změnám v organizaci jádra, jadérka nebo poruchám v tvorbě cytoskeletálních mikrotubulů. Výsledkem těchto změn tak může být potlačení druhé fáze meiotického dělení, což má za následek zablokování oddělení druhého pólového tělíska vedoucí k vzniku triploidního jedince.
3. **Polyspermické oplodnění** – jinými slovy oplodnění vajíčka více spermiemi najednou. Tento jev je však u ryb poměrně vzácný, neboť je samovolně blokován obrannými mechanismy jikry (Murata, 2003). Výjimku zde tvoří jeseteři, u kterých je polyspermické oplození pravděpodobnější díky většímu počtu jikerných mikropyli (Pšenička a kol., 2010).
4. **Vnější vlivy** – autopolyploidní stav může být rovněž navozen různými podmínkami vnějšího prostředí, které mohou způsobovat poruchy v procesu fertilizace gamet (Flajšhans a kol., 2008)

2.2.2. Alopolyplodie

K alopolyplodii dochází při mezirodové nebo mezidruhové hybridizaci. Hybridizací (křížením) vzdálených druhů může docházet k výrazným genetickým změnám, a to v důsledku sloučení rozdílných genomů obou rodičů (Flajšhans a kol., 2008). Alopolyplodie je nejčastěji spojována se změnami ve způsobu reprodukce, včetně partenogeneze, gynogeneze a hybridogeneze (Flajšhans a kol., 2013). Např. v Evropě je známo přes 90 takto vzniklých hybridních komplexů (Vrijenhoek a kol., 1989; Alves a kol., 2001).

2.3. Umělá indukce polyplodie

Pro záměrné navození triploidního nebo tetraploidního stavu jsou klíčové poznatky z mitózy a meiózy v průběhu gametogeneze (Obr.1; převzato a upraveno podle Lineage Medical, 2018)



Obr. 1 Schéma ovogeneze. PGC = primordiální gonocyty (prapohlavní buňky)

2.3.1. Mitóza

Úkolem mitózy je předat dceřiné buňce shodnou genetickou informaci a stejný počet chromozomů. V průběhu anafáze zde dochází k rovnoměrnému roztržení chromozomů a tím pádem i stejnoměrnému rozdělení genetické informace do obou budoucích buněk. Výsledkem je vznik dvou diploidních buněk (mateřské a dceřiné; Šípek, 2010-2014).

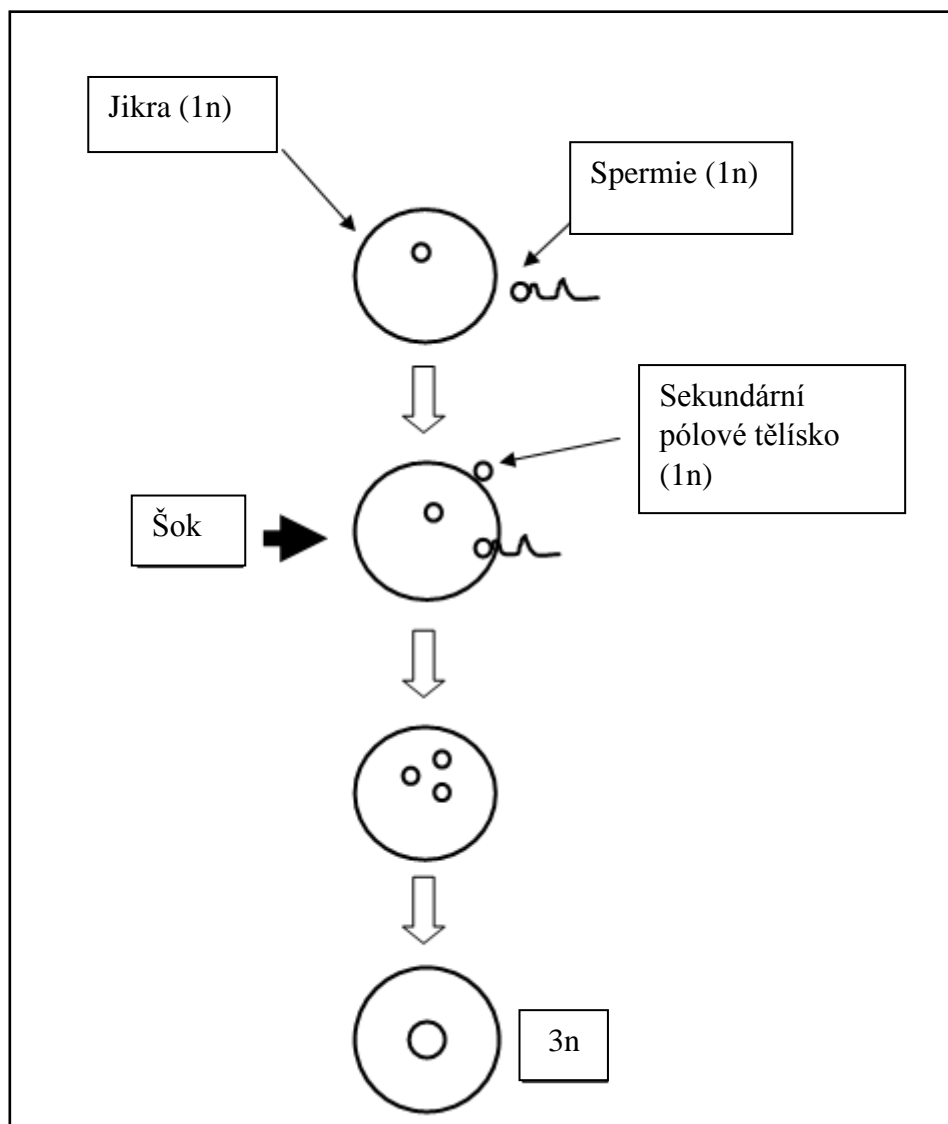
2.3.2. Meióza

Meióza je charakterizována dvěma různými způsoby dělení buněk. Při prvním tzv. redukčním (heterotypickém) způsobu dělení (meióza I.) dochází nejprve k párování homologních chromozomů. Ve vzniklém chromozomovém páru (bivalentu) zároveň dochází k překrývání chromatid, které vede k vzniku tzv. crossing-overu. V průběhu anafáze ovšem nedochází k rovnoměrnému roztržení chromozomů. Výsledkem meiózy I. je tedy vznik dvou buněk s polovičním množstvím genetické informace a polovičním počtem chromozomů. Druhé buněčné dělení (meióza II.) je shodné s běžným mitotickým dělením buňky (Šípek, 2010-2014).

Během celého meiotického cyklu dochází pouze k jedné replikaci DNA. Tento fakt umožňuje segregaci jedné kopie z každého homologního chromozomu do každé nové gamety. Výsledkem meiózy jsou čtyři haploidní gamety s jednou sadou chromozomů (Flajšhans a kol., 2013).

2.3.3. Triploidizace

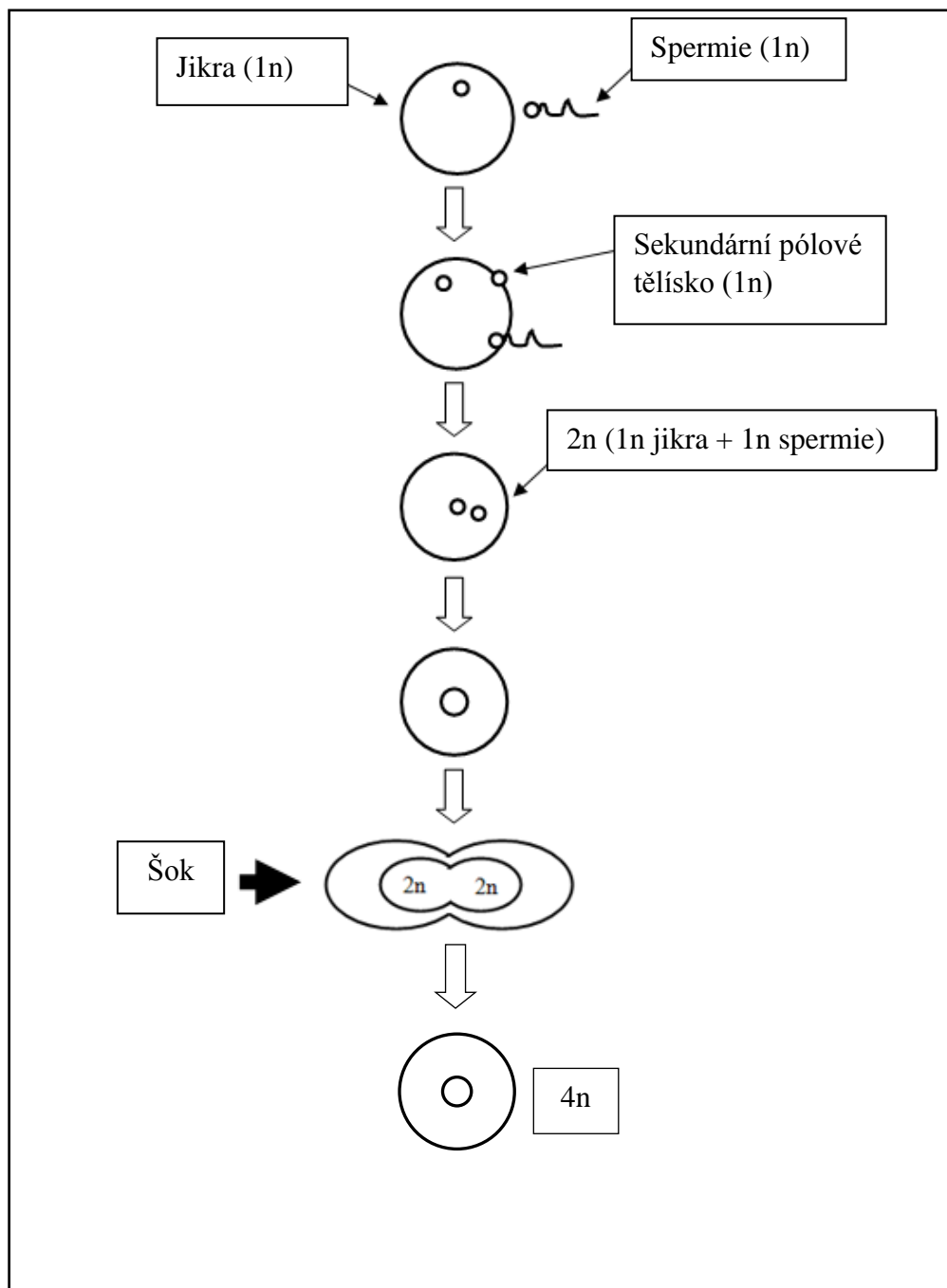
Ovulovaný ovocyt se nachází v metafázi druhého meiotického dělení a pokračování meiózy je opět nastartováno až po oplození (Pandian a Koteeswaran, 1998). Pro cílené navození triploidního stavu je nutné ovulovaný ovocyt v této fázi vystavit šoku, který povede k depolymeraci tubulinových vláken, což zabrání oddělení sekundárního pólového tělíska (Flajšhans a kol., 2013). Výsledkem je tedy organismus, jenž obsahuje jednu sadu chromozomů ze samičího prvojádra, jednu sadu ze samčího prvojádra a jednu z pólového tělíska (Flajšhans, 2008). Vznik triploidní buňky je popsán v Obr. 2 (převzato a upraveno od Flajšhans a kol., 2008).



Obr. 2 Schéma umělé indukce triploidie pomocí meiotického šoku.

2.3.4. Tetraploidizace

Při umělé indukci tetraploidie je zapotřebí postihnout šokem cytokinezi prvního mitotického dělení (první rýhování). Díky šoku dojde k depolymeraci tubulinových vláken dělicího vřeténka, což vede k zablokování procesu rozdělení duplikovaných sad do dceřiných buněk. Výsledný organismus tedy obsahuje čtyři sady chromozomů: dvě ze samičího prvojádra a dvě ze samčího prvojádra (Flajšhans a kol., 2013). Vznik tetraploidní buňky je popsán na Obr. 3 (převzato a upraveno od Flajšhanse a kol., 2008).



Obr. 3 Schéma umělé indukce tetraploidie pomocí mitotického šoku.

2.4. Druhy šoků používané při umělé polyploidizaci ryb

2.4.1. Mechanické šoky

Mechanické šoky byly používány zejména v počátcích uměle indukované polyploidie. Poprvé byly experimentálně testovány již ve 30. letech 20. století u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Oplozené jikry byly napichovány nebo po určitou dobu vystavovány otřesům o různé intenzitě. Značnou nevýhodou těchto šoků byla jejich velmi malá účinnost a vysoká mortalita takto ošetřených jiker (Flajšhans a kol., 2013).

2.4.2. Chemické šoky

Principem je použití chemikálií fungujících jako tzv. vřeténkové jedy. Tyto látky mají za následek poškození mikrotubulů dělicího vřeténka, v důsledku čehož nedojde k oddělení druhého pólového tělíska (Beaumont a Fairbrother, 1991). K tomuto účelu je možné využít např. kolchicin. Kolchicin je alkaloid využívaný zejména k umělé indukci polyploidie u rostlin. U ryb byla tato látka testována u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*). Značnou nevýhodou kolchicinu je ale to, že způsobuje mozaicismus (Smith a Lemoine, 1979).

Mezi další chemikálie používané k umělé indukci polyploidie patřil cytochalasin B. Použití této chemikálie při indukci polyploidie u lososa atlantského (*Salmo salar*) popsali Refstie a kol. (1977). Ve výsledcích tohoto experimentu bylo ale zjištěno, že cytochalasin B vede rovněž k vzniku mozaicismu. Použití cytochalasinu B pro účely akvakultury je v Evropské unii zakázáno (Piferrer a kol., 2009), avšak dříve byla tato chemikálie hojně využívána k indukci tetraploidních slávek nebo ústřic (Beaumont a Kelly, 1989; Gosling a Nolan, 1989).

Podobným způsobem byly testovány i další chemikálie (6 – dimethylaminpurin, kofein a další), přičemž největších úspěchů bylo dosaženo při použití plynného oxidu dusného. U pstruha duhového bylo zjištěno, že pro úspěšné zablokování druhého pólového tělíska je zapotřebí použít oxid dusný při tlaku zhruba 11 barů. Tímto způsobem je možné docílit až 90% úspěšnosti triploidizace (Shelton a kol., 1986).

Mezi další historické experimenty s více či méně uspokojujivými výsledky patří rovněž indukce triploidie za pomoci vysokého pH a Ca^{2+} . Ueda a kol. (1988) popsali experiment u pstruha duhového, kdy byla získána část triploidního potomstva pouze za pomoci ošetření jiker a mlíčí vysokým pH a vysokou koncentrací Ca^{2+} .

2.4.3. Fyzikální šoky

2.4.3.1. Elektrofúze

Principem elektrofúze je zadržení druhého pólového tělíska za pomoci elektrického proudu. Elektrofúze byla experimentálně testována u lososa coho (*Oncorhynchus kisutch*). Tento způsob indukce triploidie se však osvědčil pouze při kombinaci s tepelnými šoky (Teskeredžić a kol., 1993).

2.4.3.2. Tlakové šoky

V chovech ryb se tlakové šoky společně s teplotními ukázaly jako nejučinnější způsob umělé indukce triploidizace. Je to především z důvodu jejich snadného provedení a vysoké efektivity (Flajšhans a kol., 2013). Přesný princip navození triploidního stavu pomocí hydrostatického tlaku nebyl zatím důkladně zkoumán. S největší pravděpodobností má vysoký tlak za následek zabránění oddělení druhého pólového tělíska nebo zablokování funkce mikrotubulů dělicího vřetenka (Wilson a kol., 2001). Druhou méně pravděpodobnou možností je kombinace obou vlivů (Piferrer a kol., 2009). Tlakový šok se oproti teplotním šokům vyznačuje vyšší šetrností k jikrám, což se později projevuje nižší mortalitou embryí (Benfey a Sutterlin, 1984). Další předností tlakových šoků je možnost ošetření velkého počtu jiker najednou, a to včetně jiker pelagofilních druhů ryb (Piferrer a kol., 2009).

Pro úspěšné provedení tlakového šoku je nutné použít speciální tlakovou nádobu, která je připojena na kompresor, ruční pumpu nebo na tlakovou láhev se stlačeným plynem (Flajšhans a kol., 2013). Ve většině případů je využíván tlak v rozmezí 58-85 MPa. Čas pro začátek aplikace tlakového šoku se odvíjí od jednotlivých druhů ryb. Pro ryby teplomilné, jako je kapr obecný, lín obecný, amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) a další, se uvádí optimální začátek 2-7 minut od aktivace gamet. U studenomilných druhů (pstruh duhový, losos obecný a další) je optimální aplikovat šok po 15-20 minutách od aktivace. Délka expoziční doby je u obou skupin ryb podobná a pohybuje se okolo 2-6 minut (Piferrer a kol., 2009).

2.4.4. Teplotní šoky

Tyto druhy fyzikálních šoků patří mezi jedny z nejstarších a zároveň také nejpoužívanějších způsobů indukce triploidie. Již ve 40. letech 20. století byly s úspěchem testovány při navození triploidního stavu u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*; Swarup, 1959). Při použití teplotních šoků dochází k zadržení druhého pólového tělíška kombinací hned několika vlivů. Mezi tyto vlivy lze zařadit např. změnu rychlosti vývoje buněk, narušení mikrotubulů dělicího vřeténka nebo změny hustoty v cytoplazmě (Piferrer a kol., 2009). Z důvodu vysoké efektivity a nízké finanční náročnosti jsou často nadřazovány nad tlakové šoky (Thorgaard, 1986). Použití teplého nebo chladového šoku se odvíjí od druhu ryby (Felip a kol., 2001).

2.4.4.1. Chladový šok

Aplikace tohoto druhu šoku je výhodná u teplomilných druhů ryb nebo u ryb s drobnými jikrami jako např. kapr obecný, mořan zlatý (*Sparus aurata*), morčák evropský (*Dicentrarchus labrax*) aj. (Piferrer a kol., 2009). Principem chladového šoku je expozice oplozených jiker ve výrazně chladnější vodě, než je běžná teplota vody při reprodukci daných druhů. Pro zchlazení vodní lázně se běžně používá led (Flajšhans a kol., 2008). Obecně se udává, že optimální teplota vodní lázně by se měla pohybovat v rozmezí 0-4 °C. Tato hodnota se však u jednotlivých druhů ryb může mírně lišit, např. u amura bílého je to 5-7 °C, u tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) dokonce až 9 °C (Cassani a Caton 1985; Hussain a kol., 1991). Pro mořské druhy se uvádí jako optimální teplota 1-3 °C (Piferrer a kol., 2009).

U teplomilných druhů ryb by měl být šok aplikován po 2-7 minutách od aktivace jiker, přičemž expoziční doba v ledové lázni by se měla pohybovat okolo 30 minut (Piferrer a kol., 2009). Pro druhy chladnomilné se šok provádí obvykle po 15-20 minutách od aktivace, přičemž expoziční doba se značně liší druh od druhu a pohybuje se od 20 minut až po několik hodin (Flajšhans a kol., 2008).

2.4.4.2. Teplý šok

Tento druh šoku je opakem chladového šoku. To znamená, že oplodněné jikry jsou ponořeny do výrazně teplejší vody, než ve které běžně probíhá reprodukce a jejich následná inkubace. Teplota šokové lázně je nejčastěji udržována za pomoci termostatu (Flajšhans a kol., 2008). Výše teploty je na rozdíl od chladové lázně značně variabilní.

Pro ryby chladnomilné se uvádí jako vhodná teplota šokové lázně 29-30 °C. Šok by měl být aplikován 5-7 minut po aktivaci, přičemž délka expoziční doby je 10-25 minut (Malison a kol., 1993; Rougeot a kol., 2003). U ryb teplomilných se uvádí teplota lázně až 40-41 °C. Samotná aplikace šoku je prováděna 3-5 minut od aktivace (Don a Avtalion, 1986). Expoziční doba v šokové lázni je pak většinou velmi krátká, a to 1-3 minuty (Flajšhans a kol., 2008).

2.5. Faktory ovlivňující efektivitu umělé polyploidizace

Každý druh šoku je charakterizován třemi proměnnými a jejich kombinace je klíčová pro konečnou úspěšnost polyploidizačního procesu (Chourrout, 1984; Piferrer a kol., 2009).

2.5.1. Začátek šoku

Nejdůležitějším ze všech tří faktorů je právě doba zahájení šoku, která je závislá na druhu ryby a teplotě vody v průběhu inkubace jiker. Za standardní teplotu vody pro inkubaci jiker teplomilných druhů, jako je kapr, lín, sumec velký (*Silurus glanis*) a další, se považuje 20-22 °C, pro druhy chladnomilné 10 °C (lososovitě). Například při teplotě 20 °C se u kapra a lína provádí šok 5 minut od aktivace gamet, čímž dojde k postihnutí metafáze druhého meiotického dělení a tím ke vzniku triploidního jedince. Pozdější provedení šoku (43,5 min. po aktivaci) postihuje cytokinezi prvního mitotického dělení a jeho výsledkem je vznik tetraploidního jedince (Flajšhans a kol., 2008). V případě, že není použita standardní inkubační teplota, je začátek aplikace šoku vypočten pomocí hodnoty τ_0 (tau nula). Tato hodnota představuje délku jednoho mitotického cyklu (v minutách) při synchronním dělení buněk. V případě, že je hodnota τ_0 pro daný druh známa, lze za pomoci standardní teploty a použité teploty vody (nestandardní) vypočítat optimální čas pro zahájení aplikace šoku (Shelton a kol., 1997). Hodnota τ_0 je však prozatím stanovena u poměrně malého rozsahu rybích druhů.

2.5.2. Intenzita šoku

Výše intenzity šoku (teplota lázně nebo síla tlaku) značně ovlivňuje jak úspěšnost samotné polyploidizace, tak i následné přežití embryí. Obecně platí, že vyšší teplota nebo tlak indukují vyšší procento polyploidů, ale zároveň s tím neúměrně zvyšují mortalitu embryí (Flajšhans a kol., 2008).

2.5.3. Expoziční doba

Délka expoziční doby je úzce spojena s intenzitou šoku. Nepřiměřeně dlouhá expoziční doba může vést až k 100% mortalitě embryí. Naopak příliš krátká expoziční doba má za následek nízké nebo nulové procento indukce polyploidů (Cassani a Caton, 1985; Manickam, 1991).

2.6. Polyploidie v intenzivní akvakultuře

Produkce polyploidních ryb je současným trendem moderních akvakultur, kdy jsou nejčastěji indukováni jedinci triploidní (Piferrer a kol., 2009). Tetraploidní ryby jsou uplatňovány pouze při křížení s diploidními pro následnou produkci triploidů. Produkce tetraploidních ryb je nevýhodná, protože tyto ryby jsou díky vysoké homozygotnosti citlivé vůči vnějším podmínkám, což vede k jejich vysoké mortalitě (Arai, 2000). Tetraploidie je ovšem hojně využívána v intenzivních chovech mlžů, kde se běžně používá pro produkci triploidních ústřic (*Crassostrea gigas*) (Nell, 2002).

2.6.1. Výhody chovu triploidních ryb

Nejdůležitější vlastností triploidních ryb je jejich částečná nebo kompletní sterilita (Pandian a Koteeswaran, 1998). Sterilitu ryb způsobují tři sady homologních chromozomů, které se v průběhu gametogeneze nemohou rovnoměrně rozdělit (Flajšhans a kol., 2013). Pozitiva této vlastnosti potvrzují Werner a kol. (2008), kteří u triploidních pstruhů duhových zaznamenali lepší využití energie z přijatého krmiva. Tato energie je využita na růst svalové hmoty a nikoliv k tvorbě gonád. Kromě této vlastnosti popisuje stejný autor také lepší kvalitu svaloviny těchto ryb. Ta je charakterizována především zvýšenou pevností, nižším obsahem vody, vyšší výtěžností filetů a vyšším obsahem tuku. Další výhody chovu triploidních ryb popisuje Mair (1993), který tvrdí, že sterilita těchto ryb vede ke snížení jejich temperamentu a tím ke snížení ztrát v průběhu odchovu. Z ekologického hlediska má produkce triploidů význam i při chovu nebo vysazení nepůvodních druhů ryb do volných vod. Příkladem může být využití amura bílého v mělkých jezerech na Floridě, kde byl úspěšně použit na redukci makrofyt (Hanlon a kol., 2000). Alternativní využití triploidních ryb popsali i Cotter a kol. (2000). Jejich práce je zaměřena na problematiku klecového chovu lososů, kde může docházet k jejich únikům do volných vod. Ve výtěrovém období se mohou potom tyto ryby z farem zkřížit s divokými liniemi a tím znehodnotit jejich původní genom.

2.6.2. Nevýhody produkce a chovu triploidních ryb

Hlavní nevýhodou produkce polyploidních jedinců jsou vysoké ztráty v průběhu inkubace jiker a při následném odchovu plůdku (Solomon, 2003). Se zvýšením ploidie buňky dochází rovněž k zvětšování buněčného jádra i buňky samotné. Tento jev může mít dopady jak na chování ryb, tak na jejich celkový vzhled, který je zejména u larev poznamenán řadou různých malformací (Solar a kol., 1984). Tyto malformace se projevují především jako makrocefalie, lordózy, apod. Triploidizace může mít zároveň negativní dopad na vývoj žaberního víčka, a také samotných žaberních lístků, u kterých se snižuje jejich respirační plocha (Sadler a kol., 2001).

2.7. Metody určení ploidní úrovně

Pro vyhodnocení úspěšnosti indukce polyploidie, je nezbytné stanovení hladiny ploidní úrovně u nově vzniklých jedinců. V průběhu let byly vyvinuty metody, které jsou založeny na skutečnosti, že polyploidní jedinci mají navíc jednu či více sádek chromozomů a jejich jádra a buňky jsou větší (v případě jader i kondenzovanější) než u běžných diploidních jedinců (Ihssen a kol., 1990). Metody využívané ke stanovení ploidní úrovně buněk lze rozdělit na přímé a nepřímé (Wolters a kol., 1982).

Do přímých metod patří stanovení karyotypu, kvantifikace obarvených jadérek (NOR), kvantifikace obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie a mikrodenzitometrie (Flajšhans a kol., 2013).

Mezi metody nepřímé lze zařadit Coulterovu metodu, měření buněčných a jaderných geometrických charakteristik a morfologické rozdíly mezi triploidy a diploidy (Flajšhans a kol., 2008).

2.7.1. Přímé metody

2.7.1.1. Stanovení karyotypu

Pro stanovení karyotypu je klíčový celkový počet všech chromozomů v buňce. První možností je získat chromozomy z krve nebo ploutevní tkáně živých ryb. Druhou možností je získání chromozomů z ryb po jejich usmrcení. V tomto případě se chromozomy připravují z kraniální části ledvin, ze sleziny, gonád nebo žaberního epitelu (Flajšhans a kol., 2008; 2013). Stanovení karyotypu se v provozních podmínkách běžně nepoužívá, neboť je velmi náročné na čas. Na druhou stranu patří mezi nejpřesnější metody, protože

dokáže odhalit různé abnormality, jako je aneuploidie nebo heteromorfismy (Tiwary a kol., 2004; Flajšhans a kol., 2013).

2.7.1.2. Kvantifikace obarvených oblastí organizátoru jadérka (NOR)

Tato metoda spočívá v počítání obarvených oblastí organizátoru jadérek (NOR) či samotných jadérek, která se nacházejí v metafázi nebo interfázi. K obarvení a vizualizaci jadérek se používá AgNO_3 . Principem je navázání stříbra na zbytky rRNA-proteinového komplexu, jenž je syntetizován organizátorem jadérka v předešlé interfázi. Z tohoto důvodu uvedená metoda identifikuje pouze aktivní NOR (Foresti a Toledo, 1981; Flajšhans a kol., 2008).

Tímto způsobem lze u diploidní buňky napočítat pouze dvě NOR, v případě triploidních buněk se obarví tři NOR (Tiwary a kol., 2004). Tato metoda představuje levný a rychlý způsob identifikace polyploidie. Nevýhodou metody je použití pouze u druhů ryb, které mají v haploidní sadě chromozomů jen jeden chromozom s NOR (u řady ryb neodpovídá počet chromozomů s NOR v haploidní sadě skutečné ploidní úrovni). Zároveň tato metoda nedokáže odhalit mozaicismus (Flajšhans a kol., 2013).

2.7.1.3. Průtoková cytometrie

Tato metoda patří mezi přesné a rychlé metody, u ryb se začala hojně využívat již od 80. let 20. století (Ráb a kol., 2007). Její nespornou výhodou je možnost stanovení ploidní úrovně u všech věkových skupin, a to včetně rybích embryí (Flajšhans a kol., 2008). Pro průtokovou cytometrii lze použít jako zdroj buněk rybí tkáň i krev (Thorgaard a kol., 1982).

Principem průtokové cytometrie je měření obsahu buněčného jádra za pomoci fluorescence, kterou vyzařuje komplex obarvené DNA (Flajšhans a kol., 2008). Pro vyvolání fluorescence je zapotřebí nejprve zprůchodnit buněčnou membránu a následně obarvit DNA jádra za použití specifických barviv. Pro tento účel se běžně používají 4',6-diamido-2-phenylindol (DAPI) a Propidiumjodid (PI; Thorgaard a kol., 1982; Solar a kol., 1984). Méně známým, ale použitelným barvivem je také akridinová oranž (AO) (Darzynkiewicz, 1990).

Připravený a obarvený vzorek je vložen do cytometru, který zobrazuje intenzitu fluorescence analyzovaných buněk do formy histogramu. U průtokové cytometrie se vychází z předpokladu, že triploidní jedinec má tři sady chromozomů a má tedy 1,5krát

více DNA a vyšší fluorescenci než přirozeně diploidní jedinec. Proto se histogram (peak) triploidního jedince nachází na ose x 1,5krát dále než u diploida (Flajšhans a kol., 2008).

2.7.1.4. Denzitometrie

Denzitometrie je podobná průtokové cytometrii. Principem je měření absorpance barviva v buňkách nátěru, které jsou obarveny za pomoci Fulgenovy reakce (Gold a kol., 1990).

2.7.2. Nepřímé metody

2.7.2.1. Coulterova metoda

Principem Coulterovy metody je měření velikosti buňky za využití vodivého roztoku a elektrod, přičemž velikost elektrického impulzu je přímo úměrná buněčnému objemu (Flajšhans a kol., 2013). Johnson a kol. (1984) uvedli, že navzdory jejímu snadnému provedení má Coulterova metoda zhruba o 11 % procent nižší přesnost měření než průtoková cytometrie.

2.7.2.2. Měření geometrických charakteristik erytrocytů

Měření geometrických parametrů erytrocytů z obarveného krevního nátěru je levná a jednoduchá metoda identifikace polyploidních jedinců (Benfey, 1999). Principem této metody je porovnání podélné osy, šířky a plochy jádra erytrocytu s parametry erytrocytů diploidního jedince (Wolters a kol., 1982). Pro identifikaci triploidního jedince je nejvíce průkazná délka podélné osy erytrocytu, přičemž ostatní parametry se mění jen nepatrně (Flajšhans a kol., 2008). V případě vyšších plodných úrovní se měří plochy jader erytrocytu, případně jejich obvod. Je to dáno tím, že s vyšší hladinou ploidie roste i plocha jader (Svobodová a kol., 1998). Wolters a kol. (1982) uvedli, že pomocí měření geometrických charakteristik lze rozeznat polyploidní stav zhruba u 92 % případů.

2.7.2.3. Morfologické rozdíly mezi triploidy a diploidy

Tato metoda je nejméně spolehlivá a navíc ji lze použít pouze pro značně omezený okruh rybích druhů (Maxime, 2008). U alopolyplodních hybridů je možná jejich identifikace na základě rozdílného fenotypu (Flajšhans a kol., 2008). Například Lilyestrom a kol. (1999) uvedli, že triploidního hybridního sumce (*Ictalurus punctatus* x *Ictalurus furcatus*) je možné rozeznat pouze podle tmavšího zbarvení. Změna zbarvení

byla pozorována také u hybridu sivena amerického a pstruha potočního (*Salvelinus fontinalis* x *Salmo trutta* m. *fario*; Scheerer a kol., 1987).

V případě autotriploidů jsou možným rozpoznávacím znakem rozdílné šupinové vzorce a rozdíly v počtu paprsků v ploutvích. Bonar a kol. (1988) uvádějí tyto rozdíly u triploidního a diploidního amura bílého. Zároveň však dodávají, že přesnost identifikace je 65-85 %. Rozdílný počet ploutevních paprsků v řitní ploutvi byl rovněž pozorován u triploidního kapra obecného (Gomelsky a kol., 2003). U lína jsou triploidní jedinci snadno identifikovatelní podle délky a tvaru břišních ploutví (Flajšhans a kol., 1993). Rozdílné tělesné parametry u triploidů byly popsány např. u sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*) nebo u tolstolobce pestrého (*Aristichthys nobilis*) (Wolters a kol., 1982; Tave, 1993).

2.8. Triploidie u okounovitých druhů ryb

V současné době existuje jen omezené množství publikací, které se tímto tématem zabývají. U evropsky významných akvakulturních druhů jako je candát obecný a okoun říční, byla triploidie testována pouze na experimentální úrovni. Rougeot a kol. (2003) úspěšně otestovala indukci triploidie u okouna říčního za pomoci teplého šoku. Stejný druh šoku rovněž aplikovali Blecha a kol. (2016) pro triploidizaci candáta obecného. Na jikry morčáka evropského jako významného zástupce okounovitých v mořské akvakultuře byly s úspěchem použity chladové a tlakové šoky (Felip a kol., 1997).

Nejvíce publikací týkajících se triploidizace okounovitých ryb pochází ze Severní Ameriky, kde je poměrně hojně využívána v chovech candáta severoamerického (*Stizostedion vitreum*), candáta kanadského (*Stizostedion canadensis*) a okouna žlutého (*Perca flavescens*). Candát severoamerický je obecně považován za nejdůležitější druh okounovitých ryb z hlediska intenzivní akvakultury a sportovního rybolovu na území USA a Kanady. Například v roce 2013 ho bylo jen v Coloradu vyprodukováno 40 mil. kusů. Indukce triploidie u tohoto druhu je velmi žádoucí, protože je pro svou „rybářskou atraktivitu“ často vysazován do biotopů, kde není původním druhem (Fetherman a kol., 2015). Umělou triploidizaci tohoto druhu za pomoci teplého a tlakového šoku popisují např. Ewing a kol. (1989) a Malison a kol. (2001).

Candát kanadský je hojně využíván pro hybridizaci s candátem severoamerickým. Důvodem hybridizace je zvýšení organoleptických vlastností svaloviny, růstové rychlosti a v neposlední řadě také odolnosti vůči podmínkám intenzivních chovů. Triploidizace

tohoto hybridu je nezbytná, neboť je zde možné zpětné křížení s původně čistými mateřskými liniemi (Malison a kol., 1990). Podobně jako u candáta severoamerického, byly i zde pro produkci triploidních hybridů úspěšně aplikovány teplé a tlakové šoky (Garcia-Abiado a kol., 2001). Stejný autor rovněž popsal i neúspěšný pokus o indukci tetraploidizace za pomoci tlakového šoku.

Význam triploidizace u okouna žlutého je diskutovaným tématem. Efektivní indukci triploidizace za pomoci teploty a tlaku popsali Malison a kol. (1993). Bohužel v průběhu testování růstové schopnosti triploidních okounů bylo zjištěno, že samotný šok vede ke zpomalení růstu bez ohledu na počet chromozomových sad. Možným řešením, jak předejít negativním účinkům šoku, je křížení tetraploidních ryb s diploidními, za vzniku triploidních jedinců (Malison a Garcia-Abiado, 1996).

2.9. Candát obecný (*Sander lucioperca*)

2.9.1. Současná situace

V Evropě je candát obecný považován za jeden z nejhodnotnějších sladkovodních druhů ryb (Schulz a kol., 2007). Je to dáno především jeho kvalitní svalovinou, která je charakterizována vysokou dietetickou hodnotou a nízkým obsahem tuku (pouze 1-2 %). Díky této vlastnosti je vyhledávaný jak evropským trhem, tak sportovními rybáři (Lehtonen, 1985; Dil, 2008). Vlivem nadměrného odlovu z volných vod však v posledních desetiletích dochází k výraznému poklesu jeho přirozených populací. Za období 1950-2005 došlo ve volných vodách téměř k trojnásobnému snížení jeho populace. V letech 1995-2005 se průměrný roční výlověk pohyboval v rozmezí 17 000-17 500 t (FAO, 2007). Kvůli nutné ochraně candátích populací a zároveň dostatečnému zásobení trhu tímto druhem, byla v posledních 15-20 letech věnována pozornost chovu této ryby v recirkulačních systémech (RAS), a to především v Nizozemsku, Dánsku, Finsku a Francii (Policar a kol., 2016).

2.9.2. Zařazení, popis a biologie candáta obecného

Zařazení

Kmen: *Chordata* – Strunatci

Podkmen: *Vertebrata* – Obratlovci

Třída: *Osteichthies* – Ryby

Nadřád: *Teleostei* – Kostnatí

Řád: *Perciformes* – Ostnoploutví

Čeleď: *Percidae* – Okounovítí

Rod: *Sander* – Candát

Druh: *Sander lucioperca* – Candát obecný

Popis a biologie

Pro candáta je charakteristické protáhlé vřetenovité tělo, které je ze stran mírně zploštělé (Obr.4). Hlava je klínovitého tvaru. V přední části hlavy se nachází poměrně velké oči. Velká, rozeklaná ústa jsou jak na spodní, tak na horní čelisti opatřena drobnými zuby, přičemž vpředu se nachází velké, tzv. „psí zuby“ (Lusk a kol., 1992; Baruš a Oliva, 1995; Dubský, 2003). Šupiny jsou střední velikosti, typicky hřebenité a na povrchu drsné. Kromě povrchu těla pokrývají rovněž část skřetových kostí. Zbarvení je typicky šedozelené až temně modré s 8-12 tmavými příčnými pruhy. Břicho má žlutavý až bělavý nádech. (Baruš a Oliva, 1995; Dubský a kol., 2003). Charakteristické je posunutí břišních ploutví do blízkosti prsních ploutví. Ocasní ploutev je mírně vykrojena. Dvě hřbetní ploutve jsou rozděleny mezerou. U hřbetních ploutví jsou charakteristické tmavé skvrny, které jsou upořádány do řad (Lusk a kol., 1992). Baruš a Oliva (1995) uvádějí ploutevní vzorec: D₁ XII-XV; D₂ I-III, 19-23; A I-III, 9-12; P 15; V I, 5.

Candát obecný byl původně rozšířen v západní Evropě v povodí Dunaje a Labe, v severní Evropě se vyskytoval v úmoří Baltského moře a jižní části Švédska a Finska, Na východě Evropy byl znám jeho výskyt v povodí řeky Volhy. Jeho výskyt byl zjištěn i v řekách, které ústí do Černého a Kaspického moře, včetně Aralského jezera (Baruš a Oliva, 1995). Díky umělému vysazování byl však rozšířen do celé jižní a západní Evropy, včetně Balkánského poloostrova (Lusk a kol., 1992). Rovněž v České republice byl výskyt candáta významně ovlivněn umělým vysazováním. Z toho důvodu se dnes můžeme s candátem setkat téměř ve všech typech tekoucích a stojatých vod v povodí Labe, Odry a Moravy (Hanel a Lusk, 2005).

Candát se může dožít 10-15 let, dosáhnout délky až 100 cm a hmotnosti okolo 10-12 kg. Mladší skupiny ryb se sdružují typicky do hejn, oproti tomu nejstarší a největší jedinci jsou většinou samotáři (Baruš a Oliva, 1995). Růstová rychlost je významně ovlivněna prostředím, potravní nabídkou a délkou vegetačního období (Dubský, 2003; Hanel a Lusk, 2005).

Candát preferuje hluboké nádrže a řeky s tvrdým, členitým dnem, které zároveň poskytují hojnost úkrytů v podobě pařezů, potopených kmenů a kamenů (Baruš a Oliva, 1995). Vostradovská (1974) popisuje candáta jako stanovištní rybu, která se přes den zdržuje v blízkosti úkrytů, odkud poté vyplouvá za potravou. Potravní aktivita významně stoupá ve večerních hodinách a také při zvýšené zakalené vodě (Lusk a kol., 1992).

Candát je typicky dravou rybou, jehož potravu tvoří v dospělosti výhradně ryby (Baruš a Oliva, 1995). Tuto informaci doplňují Lusk a kol. (1992), který zároveň uvádí velikostní preferenci lovených ryb, a to 50-150 mm. Pro 1 kg přírůstku potřebuje candát 3,5-6 kg potravních ryb (Sedlár a Žitňan, 1974). První potravu juvenilních jedinců tvoří především vývojová stadia klanonožců (*Copepoda*) a vířníci (*Rotatoria*). Již ve velikosti 12 mm se objevuje kanibalismus, avšak většina ryb přechází na dravý způsob života až při délce 30-50 mm (Baruš a Oliva, 1995; Lusk a kol., 1992).

Nástup pohlavní dospělosti se odvíjí podle podmínek prostředí a v průměru se pohybuje od 3 do 5 let, přičemž mlíčáci dospívají o rok dříve než jikernačky (Bastl, 1969). Samotné výtěrové období je podle teploty vody situováno do dubna až konce května, kdy teplota vody dosahuje 8-16 °C (Sonesten, 1991; Dubský a kol., 2003). V této době lze u mlíčáků pozorovat pohlavní dimorfismus, který se projevuje ztmavnutím břicha nebo celého těla. Oproti tomu jikernačky mají břišní část světlejší až bílou a zároveň jsou v bříšku plnější (Dubský a kol., 2003). Informaci doplňují Baruš a Oliva (1995), kteří uvádějí, že rozpoznání pohlaví na základě uvedených znaků není vždy spolehlivé. Výtěrové období je u mlíčáků spjato s vyhledáváním vhodného trdliště pro vybudování tzv. „výtěrového hnízda“ (Erm, 1981). Jako výtěrový substrát slouží např. kořeny vodních porostů, popřípadě písčité nebo šterkovité podloží, které mlíčák důkladně očistí od nánosů. Výtěrové hnízdo se většinou nachází v hloubce kolem 1-2 metrů (Dubský a kol., 2003). Na takto připraveném hnízdě setrvá mlíčák až do výtěru. Vlastní výtěr poté probíhá jednorázově v párech (Baruš a Oliva, 1995). Množství jiker je úměrné hmotnosti jikernaček a pohybuje se v rozmezí 50 000-320 000 ks jiker. Relativní plodnost je 110 000-120 000 ks jiker na kilogram hmotnosti jikernaček (Čítek a kol., 1998). Jikry jsou žlutavé, lepivé a v průměru mají velikost 0,84-1,08 mm (Dubský a kol., 2003). Po nabobtnání se jejich velikost zvýší až na 0,9-1,4 mm (Demirkalp, 1992). Průměrná inkubační doba jiker se pohybuje od 120-150 °D (Lappalainen a kol., 2003). Po celou dobu inkubace mlíčák jikry chrání a zároveň je zbavuje kalu (Baruš a Oliva, 1995). Vylíhlé larvy dosahují délky okolo 4,5-6 mm (Schlumberger a Proteau, 1996). Žloutkový váček je podle teploty vody kompletně stráven za 6-8 dní, přičemž ústa se prořezávají

čtvrtý až šestý den po vykolení (Hamza a kol., 2007). Poté nastupuje přechod na exogenní výživu.



Obr. 4 Candát obecný (*Sander lucioperca*).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Místo pokusu

Celý pokus byl proveden v Experimentálním a rybochovném zařízení (ERZ) Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech a v laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky na téže fakultě. Pokus proběhl ve dnech 5.5.2017 až 18.5.2017. V ERZ byl proveden výtěr generačních ryb, oplodnění jiker, jednotlivé teplotní šoky oplodněných jiker a jejich následná inkubace. Ploidní úroveň vylíhnutých larev byla následně stanovena za pomoci průtokové cytometrie v již zmiňované laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky.

3.2. Generační ryby, příprava generačních ryb na umělý výtěr a umělý výtěr jiker a spermatu

K pokusu bylo celkem použito 10 mlíčáků (1568 ± 133 g) a 3 jikernačky (1612 ± 83 g) generačních candátů o stáří přibližně 3-5 let. Tyto ryby pocházely z rybníků Klatovského rybářství a.s., odkud byly přivezeny 4 týdny před předpokládaným výtěrem. V ERZ byly vysazeny do 2 gumotextilních vaků o rozměrech 2 x 5 m. Zde byly až do výtěru krmeny živými rybami v podobě střevličky východní (*Pseudorasbora parva*) a plůdku kapra obecného.

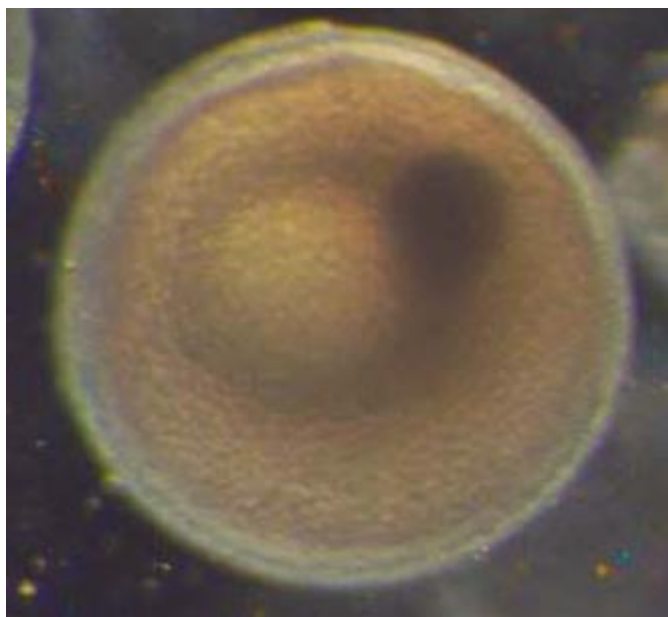
Dalším krokem byla kontrola připravenosti jikernaček k výtěru zahrnující stanovení zralosti ovocytů. To bylo provedeno pomocí katetrizace jikernaček (Obr. 5) a následné kontroly odebraných ovocytů. Vzorek odebraných ovocytů byl vložen do Petriho misky, kam bylo poté přidáno několik mililitrů Serrova roztoku (60% ethanolu, 30% formaldehydu a 10% kyseliny octové). Takto ošetřené ovocyty byly následně umístěny pod binokulární mikroskop (Olympus BX51), kde bylo stanoveno stádium jejich zralosti podle metodiky popsané v Žarski a kol. (2012).

Jikernačky ve stádiu zralosti V. (Obr. 6) byly hormonálně ošetřeny přípravkem Chorulon v dávce $500 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$. Všem mlíčákům byl posléze podán stejný hormonální přípravek v dávce $250 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$. Z důvodu zabránění spontánní ovulace jikernaček a následné ztráty jiker byla jikernačkám po hormonální injikaci preventivně zašita močopohlavní papila. Takto ošetřené generační ryby byly umístěny do nádrže, kde byla udržována stabilní teplota vody na úrovni $14 \pm 0,5$ °C. Zde byly generační ryby drženy až do začátku ovulace. Před výtěrem byly jikernačkám odstraněny stehy a poté byla každá

z ryb vytřena do samostatné misky. Odběr spermatu od mlíčáků pomocí 5ml injekční stříkačky byl uskutečněn bezprostředně po výtěru jikernaček.



Obr. 5 Odběr ovocytů od jikernačky candáta obecného pomocí katetru.



Obr. 6 V. stádium zralosti ovocytu podle Žarski a kol. (2012).

3.3. Příprava ledové lázně

Ledová lázeň byla připravena v plastové nádobě o objemu 100 litrů, kam bylo umístěno přibližně 30 litrů vody a šupinkový led, tak aby bylo dosaženo požadované teploty vody 2 °C. Z důvodu lepší tepelné izolace bylo dno a stěny vaničky potaženy bublinkovou folií. Nedílnou součástí této lázně byl také teploměr, kterým byla v průběhu pokusu nepřetržitě monitorována teplota vody.

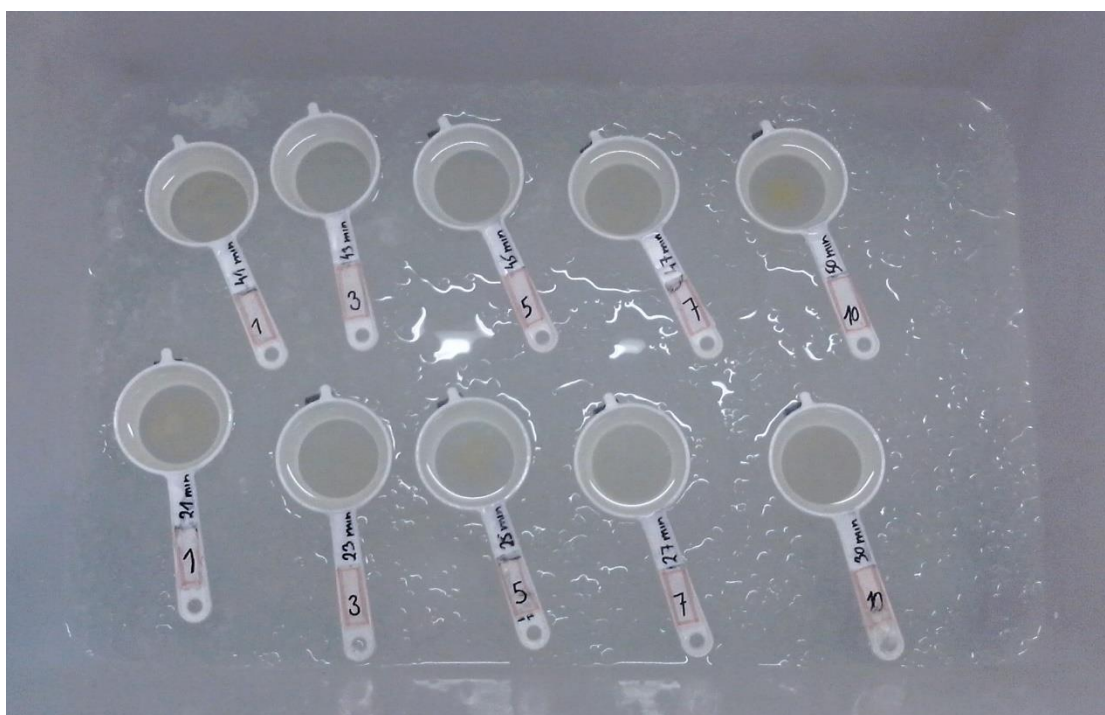
3.4. Experimentální skupiny, oplodnění a aktivace gamet

K samotnému pokusu byl ze získaných jiker vytvořen jeden směsný vzorek o hmotnosti 60 g (20 g jiker od každé jikernačky), který byl osemeněn spermatem od všech mlíčáků (1,5 ml od každé ryby). Tato směs byla následně jemně promíchána a aktivována vodou z líhně o teplotě 14,5 °C. Okamžik přidání vody ke směsi jiker a mlíčí byl označen jako čas 0, od kterého začalo měření doby od aktivace gamet po začátek a konec šoku.

Popis průběhu od aktivace gamet až po ukončení šoku:

- 1) Aktivovat osemeněné jikry vodou z líhně (60 g jiker + 120 ml vody o teplotě 14,5 °C). Začátek měření času – čas 0;
- 2) Umístit cca 3 ml aktivovaných a osemeněných jiker do šokové lázně přesně v čase 1; 3; 5; 7 a 10 minut po aktivaci. Jikry jsou zde umístěny v plovoucích sítkách (Obr. 7), se kterými je zapotřebí několikrát v průběhu šoku zahýbat, aby se částečně zamezilo jejich slepení;
- 3) Vyjmout jikry z šokové lázně po 20 a 40minutové expozici (čas 21; 23; 25; 27 a 30, respektive 41; 43; 45; 47 a 50);
- 4) Konečné odlepkování jiker směsí plnotučného mléka a vody (1 díl mléka a 1 díl vody) o teplotě 14,5 °C po dobu 50-60 minut;
- 5) Opláchnout jikry od odlepkovacího roztoku a umístit do inkubačních misek.
- 6) Inkubace při teplotě vody 14,5 °C.

Celkově bylo tedy v pokusu 5 skupin (každá o pěti opakováních) o délce expozice 20 minut a 5 skupin (každá o pěti opakováních) o délce expozice 40 minut. Dále zde byla jedna kontrolní skupina jiker, která nebyla vystavena šokové lázni. V každém z jednotlivých opakování, včetně kontroly, bylo po odlepkování náhodně vybráno 100 kusů jiker, které byly umístěny do 250 ml plastových misek sloužících k jejich inkubaci.



Obr. 7 Plastová plovoucí sítká s jikrami v šokové (ledové) lázni. Horní řada testována na čtyřicetiminutové expozici, spodní řada testována na dvacetiminutové expozici.

3.5. Inkubace jiker, péče o jikry v průběhu inkubace, kulení larev a sledování malformací u čerstvě vykulených larev

K inkubaci jiker byly použity plastové misky o objemu 250 ml. Tyto misky byly umístěny do průtočného žlabu (Obr. 8), který byl součástí malého recirkulačního systému, kde bylo možné dle potřeby regulovat teplotu vody. Ta byla za pomoci termostatu udržována na hodnotě $15 \pm 0,2$ °C. Výška vodního sloupce ve žlabu s inkubačními miskami byla cca 4 cm. Voda ve žlabu inkubačními miskami neprotékala, ale misky v ní byly pouze ponořeny. Tímto způsobem byla v inkubačních miskách udržována velmi stabilní teplota vody v průběhu celého inkubačního období. Pro zajištění dostatečného

množství kyslíku inkubujícím se jikrám bylo nutné v jednotlivých vaničkách každý den dvakrát vyměnit vodu a také průběžně pomocí kapátka odstraňovat odumřelé jikry.

Po zahájení procesu líhnutí byly jednotlivé vykulené larvy vyjmuty z inkubačních misek a přeneseny do jednolitrových plastových nádob, kde byly ponechány až do vykulení ostatních larev z příslušné skupiny. Každé experimentální skupině odpovídala jedna nádoba. V tomto období byla také počítána délka inkubace v denních stupních ($^{\circ}\text{D}$), a to na základě součtu průměrných teplot vody v jednotlivých dnech inkubace od jejího začátku až po počátek kuliní larev.

Dalším ze sledovaných ukazatelů bylo zaznamenání počtu malformovaných larev u jednotlivých skupin. Jednalo se především o vady páteře, především lordózy a skoliózy. Tyto vady byly u larev jasně zřetelné a často byly spjaty s nekoordinovanými pohyby a plaváním v kruhu. Larvy, u kterých byly takovéto vady zjištěny, byly rovněž spočteny a zaevidovány.



Obr. 8 Žlab s plastovými miskami pro inkubaci jiker.

3.6. Měření ploidní úrovně

Ploidní úroveň čerstvě vykulených larev byla stanovena za pomoci průtokového cytometru (Partec CCA GmbH, Germany; Obr. 9) Samotná analýza byla prováděna u 21 jedinců (tři opakování po sedmi) z každé experimentální skupiny a kontroly, a to následujícím způsobem:

1. Usmrtit larvy plynným CO₂;
2. Umístit jednu larvu na hodinové sklíčko a přidat několik kapek fyziologického roztoku;
3. Odříznout (pomocí skalpelu) ocasní části larvy (pro analýzu je použita pouze ocasní část bez žloutkového váčku);
4. Umístit vzorek do 2 ml zkumavky Eppendorf a přidat 200 μ m pufru k extrakci buněčných jader DAPIa (Nuclei Extraction Buffer – CyStain DNA 2step, Partec GmbH, Germany);
5. Rozmělnit vzorek pomocí laboratorního mixéru (Pellet pestle, ZORO) a nechat 10 minut reagovat s DAPIa;
6. Přidat 1 ml fluorescenčního barviva DAPIb (4',6-diamidino-2-fenylindol) ;
7. Přefiltrování suspenze přes 30 μ m filtr (CellTrics green, Wolf & Daniel) do kyvety průtokového cytometru;
8. Analýza vzorku na průtokovém cytometru (v tomto případě byla analýza vzorků prováděna při rychlosti 0,1 μ l·s⁻¹).



Obr. 9 Průtokový cytometr používaný k určení ploidní úrovně larev.

3.7. Statistické vyhodnocení dat

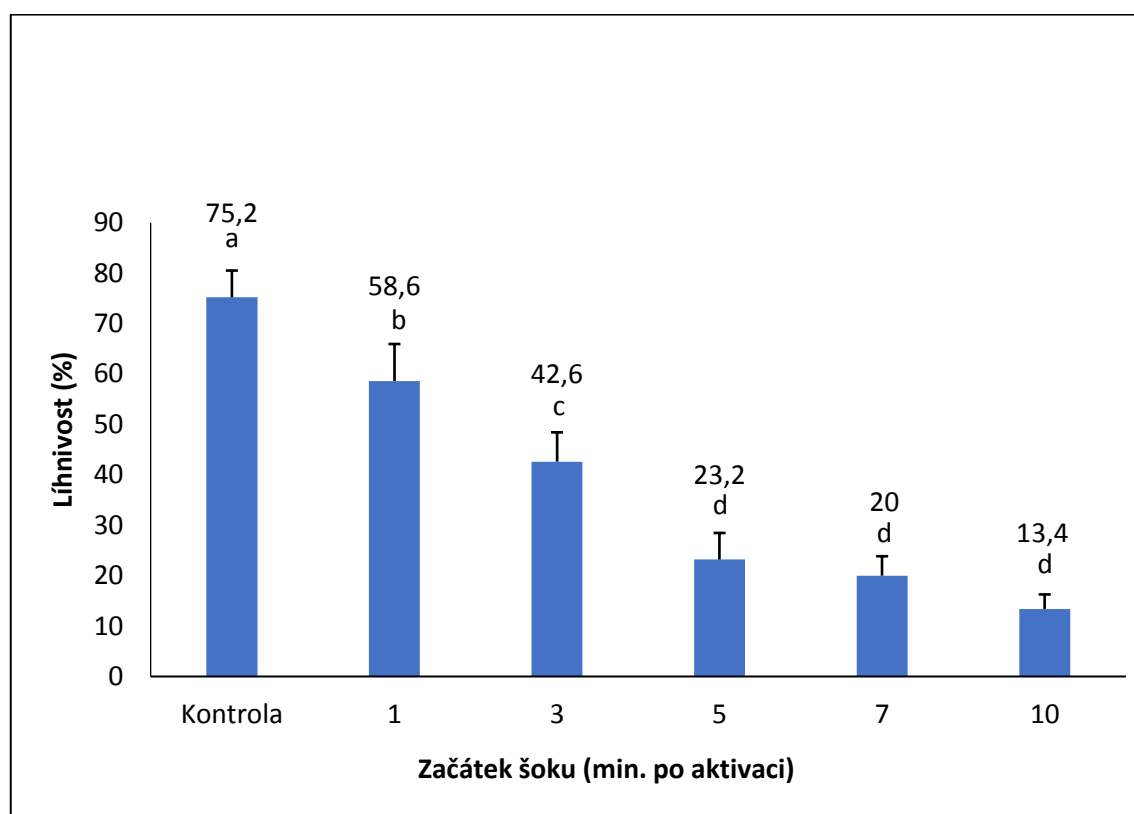
Výsledky byly analyzovány pomocí softwaru – STATISTICA 13.0. (StatSoft, Česká republika) a za pomoci programu MS Excel 2016. Naměřené hodnoty byly nejprve testovány na normalitu dat. Následně byla data testována pomocí funkce ONE-WAY ANOVA a následně Tuckeyho HSD testem. Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti ($p < 0,05$). Všechna data v % byla transformována arcsinovou transformací.

4. VÝSLEDKY

4.1. Délka inkubační doby a líhnivost

4.1.1. Délka inkubační doby a líhnivost jiker po 20minutové expozici

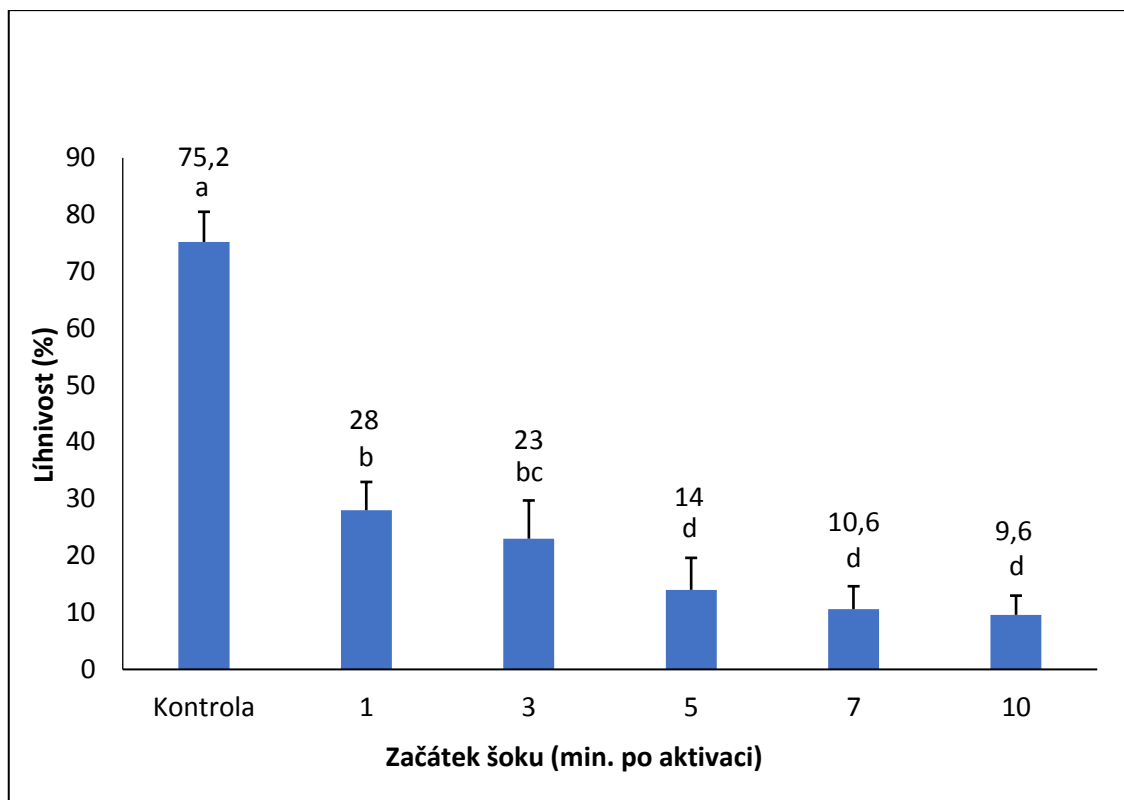
Průměrná délka inkubace jiker se ve všech skupinách pohybovala na úrovni $127 \pm 2,56$ °D. U všech testovaných skupin jiker, které byly vystaveny 20minutovému šoku, byl zjištěn statisticky významný pokles líhnivosti oproti kontrolní skupině. Dále bylo zjištěno, že s prodlužující se dobou začátku šoku se líhnivost jednotlivých skupin postupně snižuje (Graf 1).



Graf 1 Líhnivost larev v závislosti na různém začátku šoku (1; 3; 5; 7 a 10 min. od aktivace) a délce expoziční doby 20 minut. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

4.1.2. Líhnivost po 40minutové expozici

U všech skupin jiker, které byly v šokové lázni ponechány po dobu 40 minut, bylo oproti 20minutové expozici zaznamenáno snížení líhnivosti. Nejvyšší líhnivost byla pozorována u kontroly, která se zároveň statisticky lišila od všech ostatních sledovaných skupin. Průběh líhnivosti zde měl podobný charakter jako v případě šoku trvajícího 20 minut, a to že s prodlužujícím se začátkem šoku od aktivace postupně klesala líhnivost (Graf 2).

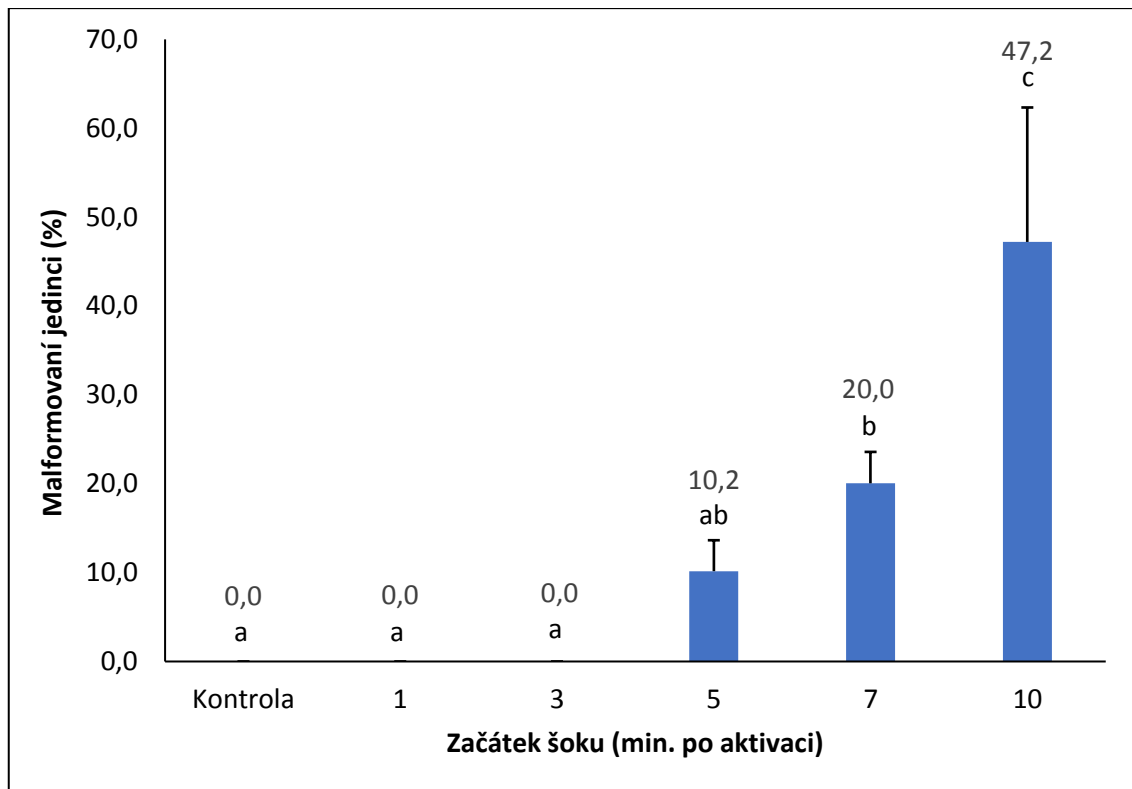


Graf 2 Líhivost larev v závislosti na různém začátku šoku (1; 3; 5; 7 a 10 min od aktivace) a délce expoziční doby 40 minut. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

4.2. Výskyt malformovaných larev

4.2.1. Výskyt malformovaných larev po 20minutové expozici

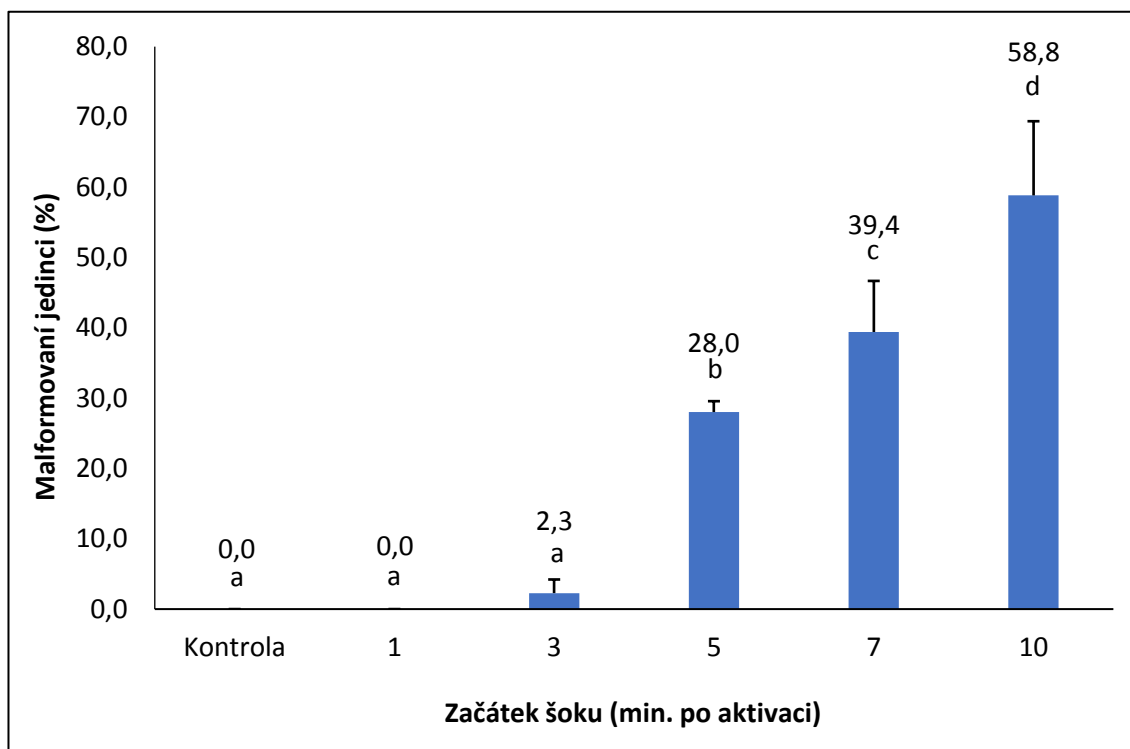
V kontrolní skupině a ve skupinách vystavených šoku po 1 a 3 minutách od aktivace nebyli zaznamenáni žádní malformovaní jedinci. Přítomnost malformovaných jedinců byla pozorována až u skupin vystavených šoku po 5; 7 a 10 minutách od aktivace, kdy nejvyšší výskyt malformovaných larev byl u jiker se začátkem šoku po 10 minutách od aktivace (Graf 3).



Graf 3 Procentuální vyjádření výskytu malformovaných larev pro jednotlivé skupin jiker šokované po 1; 3; 5; 7 a 10 minutách od aktivace a délce expoziční doby 20 minut. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

4.2.2. Výskyt malformovaných larev po 40minutové expozici

V kontrolní skupině a ve skupině vystavené šoku po 1 minutě od aktivace nebyly nalezeny žádné larvy s tělesnými deformitami. U ostatních skupin byl pozorován postupný nárůst výskytu těchto larev, kdy s prodlužující se dobou začátku šoku od aktivace jiker postupně stoupalo i množství deformovaných jedinců (Graf 4).

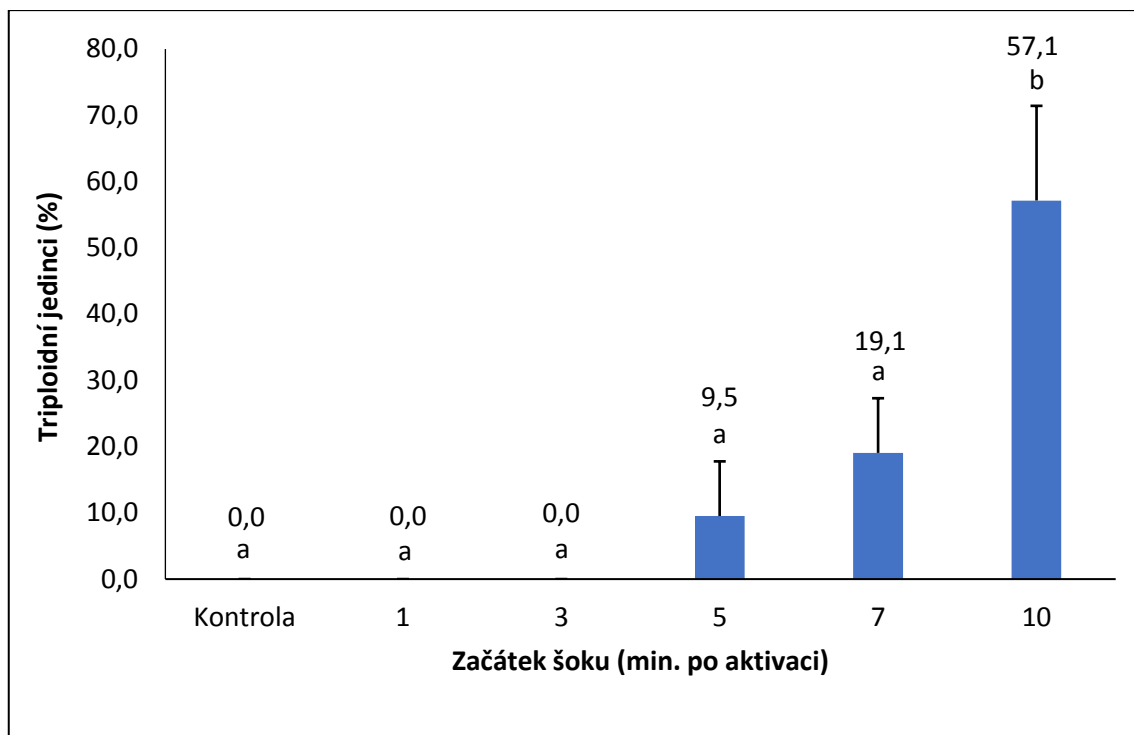


Graf 4 Procentuální vyjádření výskytu malformovaných larev pro jednotlivé skupiny jiker šokované po 1; 3; 5; 7 a 10 min. od aktivace a délce expoziční doby 40 minut. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

4.3. Výskyt triploidních larev

4.3.1. Výskyt triploidů po 20minutové expoziční době

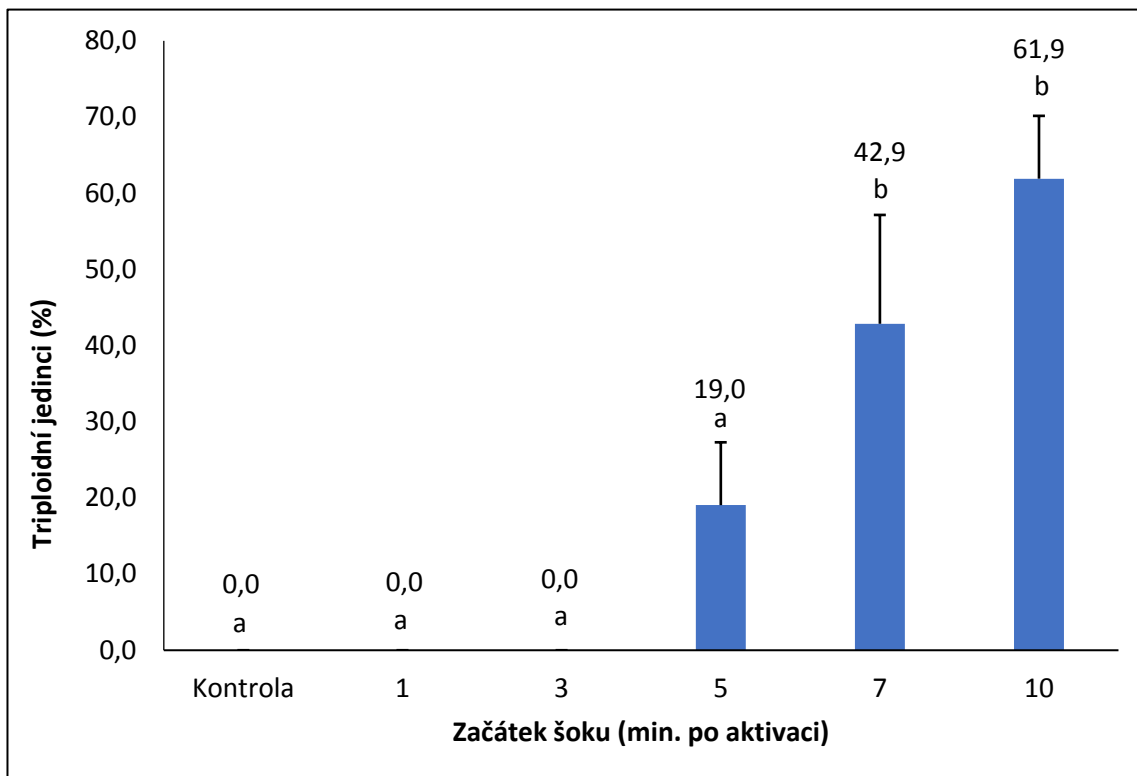
Žádná z použitých kombinací začátku šoku a 20minutové expoziční doby nevedla k indukci kompletně triploidní populace larev. U skupin se začátkem šoku po 1 a 3 minutách od aktivace nebyly zjištěny žádné triploidní larvy. V případě ostatních skupin dosáhla úspěšnost triploidizačního procesu maximálně $57,1 \pm 14,2 \%$ (Graf 5). Samotné histogramy z průtokového cytometru, který hodnotil ploidní úroveň larev, jsou zachyceny na Obr. 10 a 11.



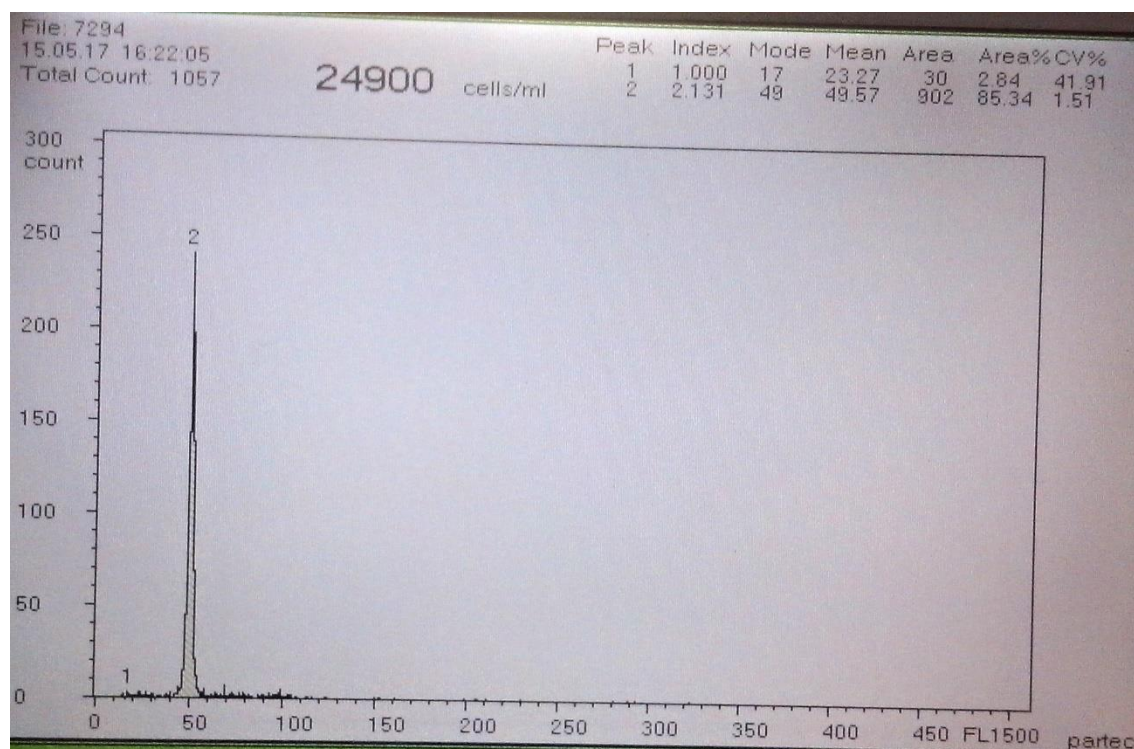
Graf 5 Procentuální výskyt triploidních larev u jednotlivých skupin jiker šokovaných po 1; 3; 5; 7 a 10 minutách od aktivace a délce expoziční doby 20 min. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

4.3.2. Výskyt triploidů po 40minutové expozici

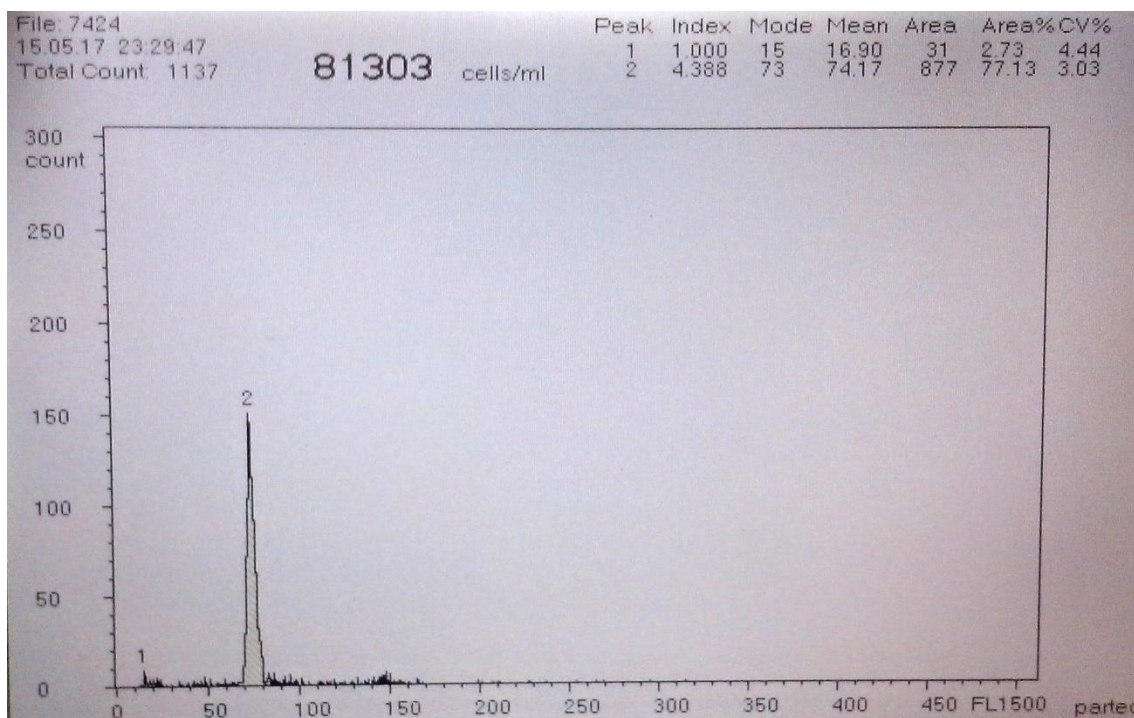
Stejně jako u dvacetiminutového šoku ani v případě 40 minut trvající expozice v šokové lázni nebylo dosaženo produkce kompletně triploidní populace larev candáta. U skupin se začátkem šoku 1 a 3 minuty po aktivaci nebyly zjištěny žádné triploidní larvy a v případě ostatních skupin měla úspěšnost triploidizačního procesu stoupající tendenci s maximem $61,9 \pm 8,24$ % u skupiny jiker vystavených šoku 10 minut po aktivaci (Graf 6).



Graf 6 Procentuální výskyt triploidních larev u jednotlivých skupin šokovaných po 1; 3; 5; 7 a 10 minutách od aktivace a délce expoziční doby 40 min. Různá písmena nad jednotlivými sloupci značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).



Obr. 10 Diploidní úroveň buněk zobrazená ve formě histogramu na kanále 50.



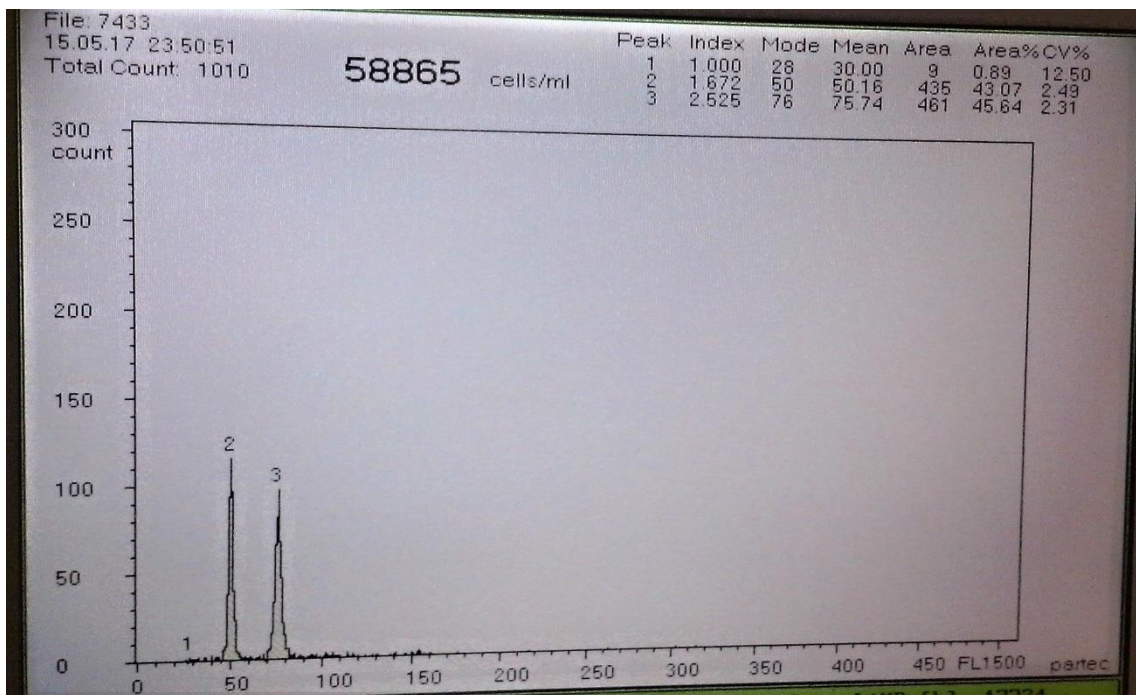
Obr. 11 Triploidní úroveň buněk zobrazená ve formě histogramu na kanále 75.

4.4. Neobvyklé ploidní úrovně

Průtoková cytometrie provedená u jednotlivých skupin vykultivovaných larev odhalila dvě nestandardní ploidní úrovně, a to haploidní úroveň larev ($1n$) a tzv. mozaicismus ($2n$ a $3n$) (Obr. 12). Výskyt obou typů neobvyklých ploidí byl v testovaných skupinách omezen pouze na několik kusů. V obou skupinách exponovaných v šokové lázni po dobu 20 a 40 minut nebyly v kontrole a ve skupinách šokovaných po 1 a 3 minutách od aktivace nalezeni žádní jedinci s neobvyklou ploidní úrovní. Po 20minutové expozici bylo nalezeno maximálně $4,8 \pm 8,24$ % haploidů, a to ve skupinách šokovaných po 5 a 10 minutách od aktivace. Expoziční doba prodloužená na 40 minut vedla ke snížení výskytu larev s touto ploidní abnormalitou, jediný výskyt byl zaznamenán u skupiny šokované po 10 minutách od aktivace, a to opět na úrovni $4,8 \pm 8,24$ %.

Mozaicismus po 20minutové expozici byl zjištěn u skupiny šokované po 5 minutách od aktivace, a to na úrovni $4,8 \pm 8,24$ %. Oproti tomu u skupin šokovaných po 7 a 10 minutách od aktivace bylo shodně zjištěno $9,5 \pm 8,24$ % larev s mozaicismem. S prodloužením expoziční doby na 40 minut se zvýšilo i procento larev s touto abnormalitou. Skupina šokovaná po 7 minutách od aktivace vykázala $19 \pm 14,2$ %

výskytu mozaicizních larev a ve skupině šokované po 10 minutách se poté výskyt těchto larev snížil na $14,3 \pm 14,2 \%$.



Obr. 12 Mozaicizní larva (2n a 3n) detekovaná přítomností dvou stejných histogramů na kanálech 50 a 75.

5. DISKUZE

Líhivost je jedním ze základních parametrů vypovídajících o kvalitě jiker. Za průměrnou líhivost jiker candáta obecného lze považovat 60-70 % (Schlumberger a Proteau, 1996, Kříšťan a kol., 2013).

V případě této studie bylo v kontrolní skupině dosaženo líhivosti $75,2 \pm 5,30$ %, čímž bylo ověřeno tvrzení výše zmíněných autorů. V porovnání s kontrolní skupinou byla u všech experimentálních skupin líhivost negativně ovlivněna provedeným šokem. Dalším zajímavým zjištěním je, že s prodlužujícím se časem začátku šoku, a to jak ve 20minutové, tak i 40minutové expozici, postupně klesala líhivost jiker. Zároveň měla 40minutová expoziční doba za následek vyšší snížení líhivosti než expoziční doba nastavená na 20 minut. V tomto ohledu se tyto výsledky částečně shodují s prací Garcia-Abiado a kol. (2001). V jejich studii byly jikry hybridního candáta *S. vitreum* x *S. canadensis* vystaveny třem různým chladovým šokům (teplota 1,2 °C, začátek 5 min. od aktivace, expoziční doba 120, 130 a 150 minut), jejichž výsledkem byla postupně se snižující líhivost z 27,6 až na 21,3 %. Trend snížení líhivosti byl zaznamenán také u mořčáka evropského (Peruzzi a Chatain, 2000). Po chladových šocích provedených po 4-7 minutách od aktivace při teplotě 0-1 °C a při expoziční době 15-20 minut byla líhivost takto šokovaných jiker snížena na úroveň 76-56 %. Z výsledků, které byly zjištěny u candátích jiker, lze odvodit, že líhivost je ovlivněna především začátkem šoku a délkou expoziční doby. Je pravděpodobné, že v případě, kdy je zvolena špatná kombinace začátku šoku a expoziční doby, dochází u jiker k omezení či zablokování produkce určitých proteinů, které jsou pro další vývoj jikry nezbytné (Maxime, 2008). Podobná souvislost byla nalezena ve studii, kterou publikovali Blecha a kol. (2016). V jejich práci byly jikry candáta obecného vystaveny teplým šokům (teplota 29 a 31 °C, začátek šoku 1; 3; 5; 7 a 10 minut po aktivaci, délka expozice 20 a 40 minut). Na rozdíl od chladového šoku provedeného v této práci, zaznamenali zmínění autoři nejvyšší líhivost v poslední skupině šokované po 10 minutách od aktivace, a to jak ve 20 tak i 40minutové expozici, což odpovídalo $11,5 \pm 1$ % (20 minut expozice) a $1,3 \pm 1,8$ % (40 minut expozice) při 29 °C. Při teplotě 31 °C byl trend rostoucí líhivosti shodný po 10 minutách od aktivace $20 \pm 5,2$ % (20 minut expozice) a $18,3 \pm 7,6$ % (40 minut expozice). Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že na procentu vylíhnutých larev se rovněž podílí i teplota šokové lázně.

Podobně jako teplota je důležitým faktorem již zmiňovaná délka expoziční doby. V případě této studie měla delší expoziční doba (40 minut) negativní vliv na výslednou líhivost. S tímto výsledkem se rovněž shodují i výsledky Blechy a kol. (2016). Z teoretického hlediska se zdá být výhodnější použití kratší expoziční doby, avšak při nižší teplotě. Tato možnost byla použita ve studii, kterou provedli Felip a kol. (1997) u mořčáka evropského. Podobně jako u candáta byly jikry mořčáka vytřeny při teplotě 12-13 °C a poté vystaveny šokové lázni 5 minut po aktivaci, při teplotě šokové lázně 0 °C a expoziční době 10 minut. Při použití této kombinace zůstává zachována líhivost až na úrovni 70 %, zároveň však efektivně indukuje triploidní stav. Problémem však zůstává skutečnost, že mořčák je původem mořský druh, z tohoto důvodu nemusí tato kombinace fungovat na sladkovodního candáta obecného.

Výskyt malformovaných larev je vedlejším výsledkem záměrné polyploidizace. Jejich výskyt je nežádoucí, a to jak z důvodů zvýšené mortality během chovu, tak i z důvodu značně omezené prodejnosti těchto ryb. Výskyt tělesných deformit je zpravidla vázán na triploidní larvy (Maxime, 2008). V této studii bylo zjištěno, že s rostoucím časem pro začátek šoku spolu s prodloužující se expoziční dobou vrůstá i procento malformovaných larev, a to jak ve 20minutové, tak i 40minutové expozici. V tomto ohledu se výsledky této studie podobají výsledkům z teplého šoku, který zpracovali Blecha a kol. (2016). Na rozdíl od chladového šoku zaznamenali Blecha a kol. (2016) nejvyšší procento malformovaných larev (74,1 %) již po jedné minutě od aktivace gamet při teplotě šokové lázně 31 °C a expoziční době 20 minut. Prodloužení expoziční doby na 40 minut vedlo k téměř nulovému výskytu larev s tělesnými deformitami, tedy k přesně opačnému jevu než tomu bylo u chladových šoků provedených v této studii. V tomto ohledu se výsledky z chladových šoků podobají výsledkům, které zjistili Gervai a kol. (1980) u kapra obecného. V jejich studii byly jikry kapra vystaveny chladovému šoku o teplotě 0 °C, a to po 1 až 9 minutách od aktivace gamet při délce expoziční doby 45 minut. Při použití této kombinace bylo ve všech testovaných skupinách zaznamenáno 30-60 % malformovaných larev. Podle trendu zjištěného u candátích jiker je pravděpodobné, že s prodloužením času pro začátek šoku by dále stoupalo i procento malformovaných jedinců. Z tohoto důvodu by bylo pro příští studie efektivnějším řešením použití vyššího rozsahu teplot v šokové lázni spolu se zkrácením expoziční doby.

K umělé indukci triploidie je možné využít celé řady různých druhů šoků. Jejich účinnost je závislá zejména na druhu ryby, velikosti jiker či teplotě vody při reprodukci (Pifferer a kol., 2009). V této práci bylo zjištěno, že chladový šok o teplotě 2 °C indukuje

první triploidní jednice až od páté minuty od aktivace gamet a že spolu s prodlužujícím se časem pro začátek šoku roste i zastoupení triploidních larev. Tento trend byl zjištěn jak u 20minutové, tak i 40minutové expozice. V tomto ohledu jsou tyto výsledky přesným opakem teplého šoku, který u candáta obecného provedli Blecha a kol. (2016). Při použití šoku o teplotě 31 °C zaznamenali nejvyšší procento triploidů (95,8-100 %) ve skupinách šokovaných po 1; 3 a 5 minutách od aktivace, při expoziční době 20 minut. Při expoziční době prodloužené na 40 minut již podíl triploidů klesal. Výsledky chladového šoku provedeného v této studii se zároveň podobají chladovým šokům, které provedla Garcia-Abiado a kol. (2001) u jiker hybridního candáta *S.vitreum* x *S.canadensis*. Zmínění autoři zaznamenali u jednotlivých sledovaných skupin velmi pozvolný vzestup v zastoupení triploidních larev, a to v rozmezí od 30 do 31,9 %. Výsledky z chladových šoků aplikovaných na jikry candáta obecného se však neshodují se zjištěními Felipa a kol. (1997), kteří použili chladové šoky na jikry mořčáka evropského (5 minut od aktivace gamet, teplota šokové lázně 0 °C, délka expoziční doby 5; 10; 15 a 20 minut). Při expoziční době 10 minut zjistili až 87% výskyt triploidních larev. Ovšem s prodloužením expoziční doby se postupně snižovalo i procento triploidních larev. Z chladového a teplého šoku aplikovaného na candátí jikry lze usoudit, že klíčovými faktory pro úspěšnost triploidizačního procesu je délka expoziční doby a začátek šoku. Tím lze jen potvrdit výrok Flajšhase a kol. (2008).

Neobvyklé ploidní úrovně jsou vedlejším efektem polyploidizačního procesu. Snaha o zadržení 2. pólového tělíška za pomoci šoku vede často ke vzniku larev s takzvaným mozaicismem. To jsou larvy, jejichž tkáň vykazují různé ploidní úrovně (2n a 3n, 2n a 4n, 1 a 3n, apod.). Neúspěšný proces triploidizace může ale na druhou stranu vést ke vzniku jedinců, kteří mají pouze jednu sadu chromozomů (takzvaní haploidi). Jedinci s různým druhem ploidních abnormalit jsou schopni přežít celou embryogenezi až do vykulení, avšak po strávení žloutkového vajíčka zpravidla hynou (Arai, 2000). Zároveň vykazují oba typy abnormalit vysoké procento malformací, které se u larev projevují celkovým zkrácením těla a deformitami hlavy (Onozato, 1984). V této studii bylo zjištěno, že chladový šok je u candátích larev schopen navodit haploidní úroveň, avšak pouze v nízkém procentuálním zastoupení (4,8 %) u všech tří skupin, kde byli haploidi nalezeni. Skupina šokovaná po 10 minutách od aktivace vykazovala výskyt haploidů jak ve 20minutové, tak i 40minutové expozici, což by mohlo teoreticky poukazovat na jistou spojitost výskytu haploidů se začátkem aplikace šoku a délkou expoziční doby. Avšak pro přesné určení podmiňující faktorů je výskyt haploidů pouze ve třech skupinách

nedostačující. Mozaicismus typu $2n$ a $3n$ byl u jiker ošetřených chladovými šoky prokázán u obou expozičních dob. Při 20minutové byl výskyt zjištěn až od 5 minut od aktivace, přičemž podíl mozaicizních larev rostl spolu s časem začátku šoku. Ve 40minutové expozici byl mozaicismus prokázán až v posledních dvou skupinách šokovaných po 7 a 10 minutách, přičemž nejvyšší procento larev s mozaicismem vykazovala skupina šokovaná po 7 minutách od aktivace. Z těchto výsledků lze říci, že výskyt mozaicismu se částečně kryje s výskytem triploidních larev a je tedy pravděpodobné, že výskyt mozaicismu je ovlivněn stejnými faktory jako výskyt triploidních larev. S tvrzením, že delší expoziční doba způsobuje vyšší procento mozaicismu, se rovněž shodují výsledky Lemoine a Smith (1980), kteří při triploidizaci sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) zaznamenali 33% výskyt mozaicizních larev typu $2n$ a $3n$.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo indukovat u jiker candáta obecného triploidní stav za pomoci chladového šoku. V tomto ohledu lze označit pokus za úspěšný, neboť se potvrdilo, že chladové šoky jsou možnou alternativou pro navození triploidního stavu u candáta. Vzhledem k tomu, že je výzkum umělé triploidizace candáta teprve na začátku, výsledky této diplomové práce zajisté poslouží pro další studie vedoucí k efektivnější a úspěšné hromadné indukci triploidních candátů, které by bylo možné využít i v komerčních chovech.

Je třeba zdůraznit skutečnost, že triploidizace candáta obecného (na rozdíl od severoamerických druhů) je teprve na svém počátku a potýká se s četnými problémy, které je potřeba dalšími výzkumy eliminovat, protože tyto problémy prozatím znemožňují využití triploidizace v praxi. Mezi tyto problémy patří především velmi nízká líhivost šokovaných jiker a vysoké procento malformovaných larev.

Na základě výsledků získaných v průběhu této práce je možné předpokládat, že s prodloužením času pro začátek šoku např. na 12; 14 nebo 16 minut od aktivace gamet by došlo k zvýšení podílu produkovaných triploidů. S největší pravděpodobností by tak mohlo být dosaženo i produkce kompletně triploidní populace larev candáta. Problémem by však zřejmě byla velice nízká líhivost jiker, spolu s vysokým výskytem tělesných deformit u vykulených larev. Z tohoto důvodu by nejspíš bylo vhodné otestovat širší spektrum teplot šokové lázně, spolu se zkrácením expoziční doby. Delší expoziční doba sice vedla k produkci většího množství triploidů, ale negativně ovlivnila líhivost a zvyšovala výskyt tělesných deformit.

Další možnou alternativou pro zvýšení výtěžku triploidů by bylo použití tlakových šoků, které jsou k jikrám šetrnější než teplotní šoky, zároveň zachovávají vysokou líhivost a efektivně indukují triploidní stav. Problémem tohoto šoku však zůstávají vysoké náklady na realizaci spolu s faktem, že do tlakové nádoby mohou být vloženy pouze odlepkované jikry. V případě studií, které se zabývaly tlakovými šoky u severoamerických candátů, problém s lepidlostí jiker odpadl, protože jikry těchto ryb jsou téměř nelepivé.

Zároveň je nutné poznamenat, že i po navození triploidní úrovně u 100 % larev a po odstranění problémů s líhivostí a malformitami zde stále zůstane spousta nezodpovězených otázek ohledně přechodu těchto ryb na exogenní výživu, ohledně růstu a dalšího přežití. Věřím, že v průběhu dalších několika let bude triploidizace candáta na

stejně úrovni jako třeba u pstruha duhového a stane se významným přínosem pro chov této velmi atraktivní ryby.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alves, M. J., Coelho, M. M., Collares-Pereira, M. J., 2001. Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish. *Genetica*. 111, 375-385.
- Arai, K., 2000. Chromosome Manipulation in Aquaculture. Recent Progress and Perspective. *Aquacult. Sci.* 48(2), 295-303.
- Baruš, V., Oliva, O., 1995. *Mihulovci a ryby*, 1. Díl. Academia Praha, 640 s.
- Bastl, I., 1969. Spawning of pikeperch (*Stizostedion lucioperca*) in bottoms nests in condition of the Orava reservoir (Northern Slovakia). *Práce Labor. rybářstva SAV*, s. 159-184.
- Beaumont, A. R., Kelly, K. S., 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132(1), 69-84.
- Beaumont, A. R., Fairbrother, J. E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish, a review. *J. shellfish. res.* 101-18.
- Benfey, T. J., Sutterlin, A. M., 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 36(4), 359-367.
- Benfey, T.J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 16, 47-52.
- Benfey, T.J., 1999. The psychology and behaviour of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7, 39-67.
- Blecha, M., Flajšhans, M., Lebeda, I., Křišťánek, J., Svačina, P., Polícar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. *Aquaculture*, 462, 115-117.
- Bonar, S. A., Thomas, G. L., Pauley, G. B., 1988. Evaluation of the separation of triploid and diploid grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, by external morphology. *J.Fish. Biol.* 33(6), 895-898.
- Carmona, R., Domezain, A., Gallego, M. G., Hernando, J. A., Rodríguez, F., Ruiz-Rejón, M. 2008. *Biology, conservation and sustainable development of sturgeons*, Springer-Verlag New York. S. 97-117
- Cassani, J. R., Caton, W. E., 1985. Induced triploidy in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 46(1), 37-44.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Aquac. Int.* 12, 181-189.
- Cotter, D., O' Donovan, V., O' Maoiléidigh, N., Rogan, G., Roche, N., Wilkins, N. P., 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture*, 186(1-2), 61-75.
- Čítek, J., Krupauer, V., Kubů, F., 1998. *Rybníkářství*. 2. aktualizované vydání, Informatorium Praha, s. 123-126.
- Darzynkiewicz, Z., 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods. Cell. Biol.* 33, 285-298.

- Demirkalp, F., Y., 1992. The reproduction biology of *Cyprinus carpio*, *Mugil cephalus*, *Stizostedion lucioperca*, in Bafrá Balík Lakes (Balíkçölü-Uzungöl). Turk. J. Zool. 16, 311-322.
- Dil, H., 2008. The European market of the pikeperch for human consumption, Percid fish culture, from research to production In : P. Fontaine, P. Kestemont, F. Teletchea, N. Wang., (Eds), Presses Universitaires de Namur, Namur, Belgium, s. 15-16.
- Don, J., Avtalion, R. R., 1986. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. Theor. Appl. Genet., 72(2), 186-192.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. Obecné rybářství. Informatorium Praha, 308 s.
- Erm, V., 1981. Koha. Tallinn Valgus. 128 s.
- Ewing, R. R., Scalet, C. G., Evenson, D. P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes (*Sander vitreum*). Prog. fish-cult. 53(3), 177-180.
- FAO. (2007) – Fishery information, data and statistics unit – Fishstat Plus: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3.2000. Capture production: quantities 1950-2005.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J., Piferrer, F., 1997. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 152(1), 287-298.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica. 111(1-3), 175-195.
- Fetherman, E. R., Lepak, J. M., Harris, D. J., 2015. Optimizing triploid walleye production in Colorado. Fort Collins (CO): Colorado Parks and Wildlife Services, Department of Natural Resources.
- Flajšhans, M., Ráb, P., 1987. Nález triploidního pstruha duhového formy kaploops (*Salmo gádrneri* kamloops). Živoč. výroba. 32 (3), 279-282.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993. Genetic studies in tench (*Tinca tinca*), high incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture. 110(3-4), 243-248.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. Genetika a šlechtění ryb. VÚRH JU Vodňany, 230 s.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Šlechtová, V.B., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. FROV JU, Vodňany, 305 s.
- Foresti, F., Toledo, L. A., 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenet. Genome Res. 31(3), 137-144.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N., 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. Nature. 401, 341.
- García-Abiado, M., A., R., Lynch Jr, W. E., Dabrowski, K., Hartman, T., 2001. Use of thermal and pressure shocks to induce triploid hybrid saugeyes (*Sander vitreum* x *Sander canadensis*). N. Am. J. Aquac. 63(2), 83-91.

- Gervai, J., Páter, S., Nagy, A., Horvath, L., Csényi, V., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*. J. Fish. Biol. 17(6), 667-671.
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp (*Cyprinus carpio*): a review. Aquat. Living. Resour. 16(5), 408-415.
- Gold, J.R., Ragland, C.J., Schliezing, L.J., 1990. Genome size variation and evolution and evolution in North American cyprinid fishes. Genet. Sel. Evol. 22, 11-29.
- Gosling, E. M., Nolan, A., 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. Aquaculture. 78(3-4), 223-228.
- Hamza, N., Mhetli, M., Kestemont, P., 2007. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Fish. Physiol. Biochem. 33(2), 121-133.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky – Rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody Vlašim, 41-352 s.
- Hanlon, S. G., Hoyer, M. V., Cichra, C. E., Canfield, D. E., 2000. Evaluation of macrophyte control in 38 Florida lakes using triploid grass carp. J. Aquat. Plant. Manag. 38, 48-54.
- Hegarty, M., Hiscock, S., 2007. Polyploidy, doubling up for evolutionary success. Curr. Biol., 17(21).
- Hussain, M. G., Chatterji, A., McAndrew, B. J., Johnstone, R., 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) using pressure, heat and cold shocks. Theor. Appl. Genet., 81(1), 6-12.
- Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture. 36(1-2), 111-126.
- Ihssen, P. E., McKay, L. R., McMillan, I., Phillips, R. B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. Trans. Am. Fish. Soc. 119(4), 698-717.
- Johnson, O. W., Rabinovich, P. R., Utter, F. M., 1984. Comparison of the reliability of a Coulter counter with a flow cytometer in determining ploidy levels in Pacific salmon. Aquaculture, 43(1-3), 99-103.
- Křišťan, J., Alavi, S. M. H., Stejskal, V., Policar, T., 2013. Hormonal induction of ovulation in pikeperch (*Sander lucioperca*) using human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue. Aquac. Int., 21(4), 811-818.
- Lappalainen, J., Dörner, H., Wysujack, K., 2003. Reproduction biology of pikeperch (*Sander lucioperca*). Ecol. Freshw. Fish. 12(2), 95-106.
- Le Comber, S.C., Smith, C., 2004. Polyploidy in fish, patterns and processes. Biol. J. Linn. Soc. 82, 431-442.
- Leggatt, R. A., Iwama, G. K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. Rev. Fish Biol. Fish. 13(3), 237-246.

- Lehtonen, H., 1985. Changes in commercially important freshwater fish stocks in the Gulf of Finland during recent decades. *Finn. Fish. Res.* 6, 61-70.
- Lemoine Jr, H. L., Smith, L. T., 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109(6), 626-631.
- Lineage Medical, Oogenesis. In: Step1.medbullets [online] 2018 [vid. 9 – 2 – 2018]. Dostupné na <http://step1.medbullets.com/reproductive/116015/oogenesis?expandLeftMenu=true>.
- Lilyestrom, C. G., Wolters, W. R., Bury, D., Rezk, M., Dunham, R. A., 1999. Growth, carcass traits, and oxygen tolerance of diploid and triploid catfish hybrids. *N. Am. J. Aquac.* 61(4), 293-303.
- Lusk S., Baruš, V., Vostradovský, J., 1992. *Ryby našich vod.* Praha Academia, 239 s.
- Mair, G.C., 1993. Chromosome-set manipulation in tilapia-techniques, problems and prospects. *Aquaculture.* 111, 227-244.
- Maistro, E. L., Lúcia Dias, A., Foresti, F., Oliveira, C., Filho, O. M., 2004., Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia.* 47(3-4), 233-239.
- Malison, J. A., Kayes, T. B., Held, J. A., Amundson, C. H., 1990. Comparative survival, growth, and reproductive development of juvenile walleye and sauger and their hybrids reared under intensive culture conditions. *Prog. Fish.cult.,* 52(2), 73-82.
- Malison, J. A., Procarione, L. S., Held, J. A., Kayes, T. B., Amundson, C. H., 1993. The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca Flavescens*). *Aquaculture.* 116(2-3), 121-133.
- Malison, J.A., Garcia-Abiado, A.R., 1996. Sex control and ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*). *J. Appl. Ichthyol.* 12, 189–194.
- Malison, J. A., Held, J. A., Weil, L. S., Kayes, T. B., Thorgaard, G. H., 2001. Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock. *N. Am. J. Aquac.* 63(1), 17-24.
- Manickam, P., 1991. Triploidy induced by cold shock in the Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Aquaculture.* 94(4), 377-379.
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish. Fish.* 9(1), 67-78.
- Molnár, T., Hancz, C., Bódis, M., Müller, T., Bercsényi, M., Horn, P., 2004. The effect of initial stocking density on growth and survival of pike-perch fingerlings reared under intensive conditions. *Aquac. Int.* 12(2), 181-189.
- Murata, K., 2003. Blocks to polyspermy in fish: a brief review. In *Aquaculture and pathobiology of crustacean and other species. Proceedings of the Thirty-second US Japan Symposium on Aquaculture Panel Symposium, Davis and Santa Barbara, California USA.* s. 1-15.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture.* 210, 69–88.
- Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture.* 43(1-3), 91-97.

- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*. 384, 167-243.
- Peruzzi, S., Chatain, B., 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*. 189(1-2), 23-37.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*. 293(3), 125-156.
- Polícar, T., Stejskal, V., Křišťan, J., Podhorec, P., Svinger, V., Bláha, M. (2013). The effect of fish size and stocking density on the weaning success of pond-cultured pikeperch *Sander lucioperca* juveniles. *Aquac. Int.* 21(4), 869-882.
- Polícar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Mráz, J., Velišek, J., Stará, A., Stejskal, V., Malinovskyi, O., Svačina, P., Samarin, A.M., 2016. Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca*) juveniles as a valuable product for growing culture. *Aquacult. Int.* 24, 1607-1626.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (Acipenser), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim. Reprod. Sci.* 117(1), 147-154.
- Rasch, E. M., Monaco, P. J., Balsano, J. S., 1982. Cytophotometric and autoradiographic evidence for functional apomixis in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa* and its related, triploid unisexuals. *Histochemistry*. 73(4), 515-533.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano, E., Ozouf-Cotaz, C. Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher Enfield, USA, s. 215-241.
- Refstie, T., Vassvik, V., Gjedrem, T., 1977. Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B. *Aquaculture*. 10(1), 65-74.
- Rougeot, C., Minet, L., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P. P., Mélard, C. 2003. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquat. Living Resour.* 16(2), 90-94.
- Sadler, J., Pankhurst, P. M., King, H. R., 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 198(3-4), 369-386.
- Sedlár J., Žitňan R., 1974: *Zubáč obyčajný*, Vyd. Obzor, Bratislava, s. 97.
- Shelton, C. J., MacDonald, A. G., Johnstone, R., 1986. Induction of triploidy in rainbow trout using nitrous oxide. *Aquaculture*. 58(1-2), 155-159.
- Shelton, W. L., Mims, S. D., Clark, J. A., Hiott, A. E., Wang, C., 1997. A temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon. *Prog. fish-cult.* 59(3), 229-234.
- Scheerer, P. D., Thorgaard, G. H., Seeb, J. E., 1987. Performance and Developmental Stability of Triploid Tiger Trout (Brown Trout ♀ X Brook Trout ♂). *Trans. Am. Fish. Soc.* 116(1), 92-97.

- Schlumberger, O., Proteau, J. P., 1996. Reproduction of pike-perch (*Stizostedion lucioperca*) in captivity. *J. Appl. Ichthyol.*, 12(3-4), 149-152.
- Schulz, C., Böhm, M., Wirth, M., Rennert, B., 2007. Effect of dietary protein on growth, feed conversion, body composition and survival of pike perch fingerlings (*Sander lucioperca*). *Aquac. Nutr.* 13(5), 373-380.
- Smith, L. T., Lemoine, H. L., 1979. Colchicine-induced polyploidy in brook trout. *Prog. fish-cult.* 41(2), 86-88.
- Solar, I. I., Donaldson, E. M., Hunter, G. A., 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture*, 42(1), 57-67.
- Solomon, D.J., 2003. The potential for restocking using all-female triploid brown trout to avoid genetic impact upon native stocks. *Aquaculture* 11, 8-30.
- Sonesten, L., 1991. The biology of pikeperch-a literature review. Information fraan Soetvattenslaboratoriet, Drottningholm (Sweden).
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajšhans, M., 1998. The First Findings on the Differences in Complete Blood Count Between Diploid and Triploid Tench, *Tinca tinca*. *Acta. Veterinaria. Brno.* 67(4), 243-248.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus*. *Genet. Med.*, 56(2), 143-155.
- Šípek, A., Mitóza. In. genetika- biologie [online] 2010 – 2014 [vid. 20 – 11 – 2017]. Dostupné na <http://www.genetika-biologie.cz/mitoza>.
- Šípek, A., Meióza. In. genetika- biologie [online] 2010 – 2014 [vid. 20 – 11 – 2017]. Dostupné na <http://www.genetika-biologie.cz/content/mei-za>.
- Tave, D., 1993. Growth of triploid and diploid bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. *J. Appl. Ichthyol.* 2(2), 13-26.
- Teskeredžić, E., Teskeredžić, Z., Donaldson, E. M., McLean, E., Solar, I., 1993. Triploidization of coho salmon following application of heat and electric shocks. *Aquaculture*, 116(2-3), 287-294.
- Thorgaard, G. H., Rabinovitch, P. S., Shen, M. W., Gall, G. A., Propp, J., Utter, F. M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*. 29(3-4), 305-309.
- Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*. 57, 57-64.
- Tiwary, B. K., Kirubakaran, R., Ray, A. K., 2004. The biology of triploid fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14(4), 391-402.
- Ueda, T., Sato, R. and Kobayashi, J., 1988. Triploid rainbow trout induced by high pH multiplied by high calcium. *Nippon. Suisan. Gakkaishi.* 54, 2045.
- Vostradovská M., 1974, Výsledky individuálního značkování cejna (*Abramis brama*), lína obecného (*Tinca tinca*), okouna (*Perca fluviatilis*) a candáta (*Stizostedion lucioperca*) v údolní nádrži Lipno. *Živoč. výroba*, 19 (9), 641-650.

- Vrijenhoek, R.C., Dawley, R.M., Cole, C.J., Bogart, J.P., 1989. A list of the known unisexual vertebrates. In: Dawley, R.M., Bogart, R.P. (Eds.), *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Bulletin New York State Mus., Albany, New York, s. 19-23.
- Werner, C., Poontawee, K. E., Mueller-Belecke, A., Hoerstgen-Schwark, G., Wicke, M., 2008. Flesh characteristics of pan-size triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in a commercial fish farm. *Arch. Tierzucht*. 51(1), 71.
- Wilson, R.G., Zimmerman, S., Zimmerman A.M., 2001. The effects of hydrostatic pressure-induced changes on the cytoskeleton and on the regulation of gene expression in pheochromocytoma (pc-12) cells. *Cell. Biol. Inter.*, 25, s. 667-677.
- Wolters, W. R., Chrisman, C. L., Libey, G. S., 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.* 20(3), 253-258.
- Xiao, J., Zou, T., Chen, Y., Chen, L., Liu, S., Tao, M., You, C., 2011. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. *BMC. Genet.*, 12(1), 20.
- Żarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Palińska, K., Kupren, K., Fontaine, P., Kestemont, P., 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca*, and its application during artificial reproduction. *Aquacult. Res.*43(5), 713-721.
- Zhang, Q., Arai, K., 1999. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol. Res.* 46(2), 153-161.
- Zhang, S. Y., Li, G., Wu, H. B., Liu, X. G., Yao, Y. H., Tao, L., Liu, H., 2011. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacult. Eng.* 45(3), 93-102.

8. ABSTRAKT

Cílem této studie bylo indukovat triploidní stav u candáta obecného za pomoci chladového šoku. Pro navození triploidie byly oplozené jikry, aktivované při 14,5 °C, ponořeny do ledové lázně o teplotě 2 °C. Jikry byly šokovány po 1,3,5,7 a 10 minutách od aktivace při délce expoziční doby 20 a 40 minut. Ploidní úroveň vykulených larev byla poté stanovena za pomoci průtokové cytometrie. Šok aplikovaný na jikry vedl ve všech testovaných skupinách k postupnému snížení líhivosti, a to jak ve 20minutové (58,4-13,4 %), tak i ve 40minutové expozici (28-9,6 %). Zastoupení malformovaných larev se zvyšovalo spolu s časem pro začátek šoku a s délkou expoziční doby, při 20minutové expozici bylo zjištěno 0-47,2 % a při 40minutové expozici 0-58,8 %. Žádná z testovaných kombinací nedokázala navodit triploidní stav u 100 % larev. Výskyt triploidních larev se zvyšoval spolu se začátkem šoku a s délkou expozice, nejvyšší zastoupení triploidních larev bylo zjištěno ve skupině šokované po 10 minutách od aktivace, a to jak ve 20minutové (57,1 ± 14,2 %), tak ve 40minutové expozici (61,9 ± 8,2 %). Nejdůležitějším poznatkem této studie je skutečnost, že jsou chladové šoky schopny indukovat triploidní stav u candátích jiker. Pro navození triploidie u 100 % larev je nutné provést další výzkum, který by zahrnoval zkrácení expoziční doby a vyšší rozsah teplot v šokové lázni, čímž by se částečně eliminovala nízká líhivost a zastoupení tělesných deformit u larev.

Klíčová slova: Triploidizace, malformace, larva, candát obecný, chladový šok, průtoková cytometrie.

9. ABSTRACT

The aim of this study was to induce the triploidy in pikeperch (*Sander lucioperca*) with use of a cold shock. To induce the triploidy, fertilised egg were (spawning temperature 14,5 °C) submerged in a cold bath at the temperature of 2 °C. Time of initiation was 1; 3; 5; 7 and 10 minutes post activation. The exposure time was 20 and 40 minutes. Ploidy level of freshly hatched larvae was assessed with use of the flow cytometry. In both exposure times, the hatching rate was getting lower with later time of initiation (20 minutes exposure, hatching rate: 58,4-13,4 %; 40 minutes exposure, hatching rate: 28-9,6 %). Number of malformed larvae increased with later time of initiation and longer exposure time (20 minutes exposure, malformed larvae 0-47,2 %; 40 minutes exposure, malformed larvae 0-58,8 %). None of the tested combination of exposure time and time of initiation led to a population containing 100 % triploid larvae. However, percentage of triploid larvae grew up with longer exposure time and later time of initiation. The best cold shock combination with highest yield of triploids were after 20 minutes long treatment initiated 10 minutes post activation ($57,1 \pm 14,2$ %) and after 40 minutes long treatment initiated 10 minutes post activation ($61,9 \pm 8,2$ %). The most important finding of this study is that cold shock treatment leads to triploidy in pikeperch. To obtain 100% triploid larvae, shorter exposure time and different shock temperature might be applied. It may also eliminate low hatching rate and high appearance of malformed larvae.

Key words: Triploidisation, malformation, larvae, pikeperch, cold shock, flow cytometry.