

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářství a hydrobiologický

Bakalářská práce

ELEKTROSTIMULACE SPERMIACE U RAKŮ

Autor: Jan Kubec

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Antonín Kouba, Ph.D.

Hamid Niksirat Hashjin, MSc.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: III.

České Budějovice, 2012

Prohlášení:

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

Datum:

Podpis:

Poděkování:

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

Experimenty v rámci mé bakalářské práce byly realizovány s podporou grantového projektu Grantové agentury ČR: P502/12/P177 – Basic biology of crayfish sperm with emphasis on the molecular and morphological modifications during capacitation and acrosome reaction.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2010/2011

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

Jméno a příjmení: **Jan KUBEC**
Osobní číslo: **V09B072P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Elektrostimulace spermiace u raků**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem diplomové práce bude vypracovat literární rešerši zaměřenou na problematiku získávání spermatu u korýšů a následně prakticky ověřit možnost získávání spermatu od jednotlivých druhů raků pomocí elektrostimulace.

V rámci vypracování BP bude v první řadě zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku získávání spermatu u korýšů. Praktickou náplní práce bude ověřit možnost získávání spermatu od jednotlivých druhů raků pomocí elektrostimulace.

Zjištěná data budou porovnána s dostupnou literaturou. Práce bude probíhat v laboratořích a v rybochovném objektu VÚRH JU.

Práce bude podporována výzkumným záměrem VÚRH JU MSM6007665809 a grantem MZe QF71305.

Rozsah grafických prací: 15 - 30 tabulek a grafů
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran textu
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Antonín Kouba**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Ostatní konzultanti: **Hamid Niksirat Hashjin**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **30. listopadu 2010**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

ČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Želivá 732/II
389 25 Vodňany IČ


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

Obsah

1. ÚVOD	- 7 -
2. CÍL PRÁCE	- 8 -
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 9 -
3.1. ZÍSKÁVÁNÍ SPERMATU U RYB	- 10 -
3.2. ELEKTROSTIMULACE.....	- 12 -
3.3. REPRODUKCE KORÝŠŮ	- 16 -
3.3.1. <i>Reprodukce krevet</i>	- 16 -
3.3.2. <i>Reprodukce humrů</i>	- 17 -
3.3.3. <i>Reprodukce a pohlavní soustava raků</i>	- 18 -
3.3.4. <i>Životní cyklus raků</i>	- 26 -
4. MATERIÁL A METODIKA	- 30 -
4.1. ZAŘÍZENÍ	- 30 -
4.2. POSTUP EXPERIMENTŮ	- 31 -
4.3. DESIGN EXPERIMENTŮ	- 33 -
4.4. TECHNIKA ELEKTROSTIMULACE.....	- 36 -
4.5. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ NA T. E. M.....	- 37 -
5. VÝSLEDKY	- 40 -
5.1. TECHNIKA ELEKTROSTIMULACE.....	- 40 -
5.2. VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ	- 40 -
5.3. VÝSLEDKY T. E. M. A AKTIVITY SPERMIÍ	- 43 -
6. DISKUZE	- 44 -
7. ZÁVĚR	- 47 -
8. LITERATURA	- 48 -
9. SEZNAM PŘÍLOH	- 52 -
10. PŘÍLOHY	- 53 -
11. ABSTRAKT	- 56 -
12. ABSTRACT	- 57 -

1. Úvod

Korýši – rozsáhlá skupina členovců žijících nejen ve sladké a slané vodě, ale i na souši zahrnuje drobné druhy, jako buchanky nebo perloočky, nebo známější druhy živočichů, jako jsou např. štíři, krabi, krevety, humři a v neposlední řadě i raci. Tato práce je zaměřena především na řád desetinožců (Decapoda), kam patří, v této práci, zkoumaní raci. Pro řád Decapoda je jedním z typických znaků pevná vnější kostra složená z chitinu a CaCO_3 , která je během jejich života opakovaně svlékána. Dalšími charakteristickými znaky je pět párů kráčivých nohou, u některých druhů bývá první pár specializován různými modifikacemi, např. klepety.

První psaná zmínka o racích je datována až k Aristotelovi a od té doby byli raci sice studováni, ale bohužel jen okrajově. O anatomii, biologii i páření raků jsme se již dozvěděli mnohé. Vzhledem k tomu, že se raci těší poměrně velikému zájmu, a díky rozvoji nových metod studia tak můžeme rozkrýt některé doposud nezodpovězené otázky ohledně reprodukce této skupiny živočichů. Přesněji, stále víme velmi málo o vývoji samčích gamet a především o možnostech umělého oplodnění, které je nezbytné pro jejich řízenou reprodukci. K vyřešení těchto otázek je potřeba účinné metody pro získání spermatu, které je u raků mnohem obtížnější a méně rozpracované než u jiných vodních živočichů - ryb.

Jedním z hlavních aspektů širokého poznání anatomie, biologie, chování a reprodukce ryb, na rozdíl od řádu Decapoda, je dlouholeté seznamování s těmito živočichy. S rybami, jako produkty akvakultury, bylo nakládáno již ve Starověké Číně a v Římské říši (první rybářský zákon). Ve středověku byly již zakládány první rybníky za účelem chovu ryb. Zvláště velký vliv na rozšíření chovu ryb měla ve středověku církev, neboť považovala rybí maso za „postní jídlo“. Ryby se tak stávaly nedílnou součástí „jídelníčku“ šlechty a především chudých lidí, což vedlo k rozšíření poznání reprodukce ryb. Ryby jsou tak studovány již po několik století, zatímco korýšům, zvláště rakům, je pozornost věnována především teprve po několik posledních desetiletí. Jejich význam v akvakultuře je však velice rozsáhlý a důležitý. Ve vodním prostředí vystupují totiž jako predátoři, slouží jako potrava pro jiné ryby a působí také jako detritivori, čímž jsou důležitým prvkem v koloběhu živin a energie ve vodním ekosystému.

2. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je vypracování literární rešerše zaměřené na problematiku získávání spermatu u korýšů a následně praktické ověření možnosti získávání spermatu od jednotlivých druhů raků pomocí elektrostimulace.

3. Literární přehled

Systematika druhů raků žijících v ČR a druhů korýšů podrobených elektrostimulaci (Kooda-Cisco a Talbot, 1983; Sandifer et al., 1984; Jerry, 2001; Kozák et al., 2009).

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

<u>Podřád:</u>	Pleocyemata
<u>Infrařád:</u>	Astacidea

<u>Nadčeleď:</u>	Nephropoidea	Humři
------------------	--------------	-------

<u>Čeleď:</u> Nephropidae	<u>Rod:</u> <i>Homarus</i>	<u>Druh:</u> <i>H. americanus</i> (humr americký)
------------------------------	-------------------------------	---

<u>Nadčeleď:</u>	Astacoide	Raci
------------------	-----------	------

<u>Čeleď:</u> Cambaridae	<u>Podčeleď:</u> Cambarinae	<u>Rod:</u> <i>Orconectes</i> <i>Procambarus</i>	<u>Druh:</u> <i>O. limosus</i> (rak pruhovaný) <i>P. clarkii</i> (rak červený)
Astacidae	Pacifastacidae	<i>Pacifastacus</i>	<i>P. leniusculus</i> (rak signální)
	Astacinae	<i>Astacus</i> <i>Austropotamobius</i>	<i>A. astacus</i> (rak říční) <i>A. torrentium</i> (rak kamenáč)
Parastacidae		<i>Cherax</i>	<i>C. destructor</i>

<u>Podřád:</u>	Dendrobranchiata
-----------------------	------------------

<u>Nadčeleď:</u>	Penaeoidea
------------------	------------

<u>Čeleď:</u> Penaeidae	<u>Rod:</u> <i>Penaeus</i>	<u>Druh:</u> <i>P. setiferus</i> <i>P. stylirostris</i> <i>P. vannamei</i>
----------------------------	-------------------------------	---

3.1. Získávání spermatu u ryb

U ryb jako u vodních živočichů dochází k přirozenému rozmnožování ve vodním prostředí, kdy samotná reprodukce i přežití nových jedinců záleží na biotických i abiotických faktorech. Z tohoto důvodu, ale i z důvodu komerčního užití se neustále rozvíjí techniky umělé reprodukce ryb. Velmi podstatnou částí umělé (řízené) reprodukce ryb je tzv. umělý výtěr, při němž jsou získávány gamety – jikry od samic a spermie (mlíčí) od samců.

Techniky získávání spermatu u samic jsou většinou druhově specifické. U kaprovitých a lososovitých se k získání spermatu používá metoda manuálního vytlačení z těla ryby. Lusk et al. (1987) popisuje princip této metody jako obdobný postup při výtěru samic. Samce uchopíme rukou do vlhké utěrky za hlavou mezi skřelemi a prsními ploutvemi, poté mu osušíme břišní partie včetně řitního otvoru a řitní ploutve (v případě výtěru samic přímo na jikry tak zajistíme, aby se nedostala žádná voda se stékajícími spermii do misky s jikrami). Po usušení začneme s jemnou nenásilnou masáží boků ryby směrem od hlavy až k pohlavnímu otvoru. Takto ejakulované spermie mohou být přímo vytřeny na jikry nebo odebrány do suchých zkumavek a uloženy k pozdějšímu použití do chladničky (Krupauer a Kubů, 1985; Hamáčková et al., 2008; Kouřil et al., 2008). Kouřil a Kubů (1985) uvádí možnost injekce hormonálních přípravků. Nejčastěji se používá aplikace kapří hypofýzy nebo hormonu gonadotropinu (GnRH) pro urychlení dozrávání spermii. Hypofyzace mlíčáků se provádí obvykle jednorázově a místo vpichu se doporučuje dezinfikovat.

Při umělém výtěru štiky obecné (*Esox lucius*) a keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) jsou samci kvůli nedostatečně účinným metodám získávání spermatu zabíjeni. Ryba je nejprve podrobena kontrole zralosti a poté usmrcena. Mlíčí se tak získává disekcí zabitých samic a vyjmutím jejich gonád. V tomto případě je třeba dbát s největší opatrností na to, aby nedošlo ke znehodnocení pohlavních produktů močí. Zralé gonády se vyznačují bílou až krémově bílou barvou. Po vyjmutí gonád z těla ryby dojde k jejich osušení a rozstříhání nůžkami. Kousky gonád se tak lépe promačkají přes suché sítko nebo jemné plátýnko. Po tomto procesu mohou být spermie přímo aplikovány na jikry nebo uchovány pro pozdější použití (Hamáčková et al., 2007; Lusk a Krčál, 1982).

Samci velkých druhů ryb, jako je sumec velký (*Silurus glanis*) nebo jeseteři (rod *Acipenser*), se vytírají pomocí injekční stříkačky. Princip této metody spočívá v hypofyzaci samců nejlépe 2 dny před výtěrem jikernaček. Při výtěru mlíčáků není potřebná anestezie. Mlíčák se uchopí za prsní ploutve a ocasní násadec, poté se položí na výtěrový stůl hřbetem dolů a místo pohlavní otvoru se důkladně osuší. Sperma je odebíráno pomocí suché kanyly o délce cca 20 cm se zastřiženým koncem do špičky pro snadnější zavádění. Odsávací kanyla se zasune do chámovodu a druhý konec se vloží do suché zkumavky. Zkumavka musí být výškově níž, než je tělo ryby, a sperma poté samovolně vytéká. V případě problémů s vytékáním spermatu je možné pomocí masáže břišní dutiny obnovit výtok spermatu (Kouřil et al., 1992; Gela et al., 2008).

Anestetika

Při získávání spermatu mohou být použita i anestetika. Důvod jejich použití může být lepší manipulace s rybou, menší riziko mechanického poškození samců i jiné. Jedna z nevýhod používání anestetik je vyšší úmrtnost u některých druhů ryb, které jsou velmi náchylné na nedostatek kyslíku. Kolářová et al. (2007) popisují klinické příznaky anestetik na rybách:

- klidné chování – ryba je ve fyziologické poloze, má pravidelné dýchací pohyby, normální pohybovou aktivitu, při plavání se bez námahy vyhýbá překážkám
- excitace – ryba je ve fyziologické poloze, vykazuje však zvýšenou aktivitu, neklid, rychlé plavání, při plavání se nevyhýbá překážkám, má silné obranné reflexy, nepravidelné dýchací pohyby – u některých druhů ryb mělké dýchací pohyby, u jiných naopak roztažená skřelová víčka
- celkové povrchní znecitlivění – ryba vykazuje sníženou aktivitu, pomalu se naklání na bok, ztrácí obranné reflexy, vyjma akustického, dýchací pohyby jsou již pravidelné, klidné, hluboké, zpomalující se
- celkové úplné znecitlivění – útlum vyšších mozkových funkcí, ryba nevnímá bolest a nachází se v boční poloze, vykazuje naprostou ztrátu pohyblivosti, je bez obranných reflexů, vyjma akustického, dýchací pohyby jsou pravidelné, klidné, hluboké, zpomalené
- zástava dýchání – ryba je v bočním postavení, dýchací pohyby jsou zcela zastavené nebo jen povrchní (mělké, až zanikající, bez obranných reflexů včetně akustického)

Nejčastěji používaná anestetika jsou:

Menocain: 3 – ethoxycarbonylfenyl – bílá až slabě žlutá krystalická látka rozpustná ve vodě. Tuto látku je zapotřebí chránit před světlem. Vlastní přípravek je složený z účinné látky a chloridu sodného v poměru 1:1. Menocain je hydoskopická látka, která při krátkodobém skladování v neporušených sáčcích nepodléhá změnám ani ve vlhkém prostředí (Kráal a Svobodová, 1990).

MS 222: tricain methanosulfonát – jedná se o bílý prášek, rozpustný ve vodě (nástupce Menocainu). Jeho koncentrace závisí na druhu ryb, věkové kategorii ryb, teplotě vody a volbě účinku (Kolářová et al., 2007).

2 - phenoxyethanol: ethylen glykol monophenyl ether – má přesně definované chemické složení. Anestezie nastává do 5 – 10 minut a doba zotavení v čerstvé kyslíkaté vodě je zhruba 10 minut. Může se používat k sedaci, imobilizaci a anestezii. Tento přípravek není registrovaný, jeho použití je možné pouze na předpis veterinárního lékaře (Kolářová et al., 2007).

Hřebíčkový olej: účinná látka eugenol – jedná se o látku přírodního původu získanou destilací z rostliny *Eugenia aromatica* nebo *Eugenia caryophyllata*. Přednost tohoto anestetika je přírodní původ účinné látky, zároveň je i jeho nevýhodou (nelze přesně definovat složení jednotlivých šarží hřebíčkového oleje, to je nepřípustné pro registrační dokumentaci). Anestezie nastává do 5 – 10 minut a doba zotavení ryby je delší než u jiných anestetik. Není registrovaný a jeho použití je možné pouze na předpis veterinárního lékaře (Kolářová et al., 2007).

3.2. Elektrostimulace

Elektrostimulace je metoda získávání spermatu od hospodářských zvířat pomocí elektrických stimulů dodávaných do těla samců. Poprvé tuto metodu použil Australan Gunn v roce 1936 u beranů (Kliment et al., 1989). Od této doby byla elektrostimulace rozvíjena a modifikována pro širší užití, dnes je používána k získání spermatu také u samců býků, kozlů a psů, u kanců se doporučuje jen v případě impotence plemeníků. Tato metoda byla v minulých letech také využita k získávání spermatoforů se spermii od vyšších korýšů, přesněji se jednalo o humra amerického (*Homarus americanus*), australského sladkovodního raka (*Cherax destructor*) a mořských krevet rodu *Penaeus*.

Elektrostimulace hospodářských zvířat

Metoda odběru ejakulátu je založena na stimulaci elektrickým proudem. Zdrojem střídavého proudu může být síťový proud, baterie, malý generátor nebo přenosné dynamo. Přístroj tvoří elektroda, voltmetr, transformátor, miliampérmetr, přerušovač napětí a regulátor délky impulsů. Tvar elektrod je paličkový nebo prstencový. Napětí potřebné k elektrickému stimulu samců se pohybuje v rozmezí od 3 do 20 V, u beranů spíše mezi 12 – 15 V (Kliment et al., 1989).

Kliment et al. (1989) dále uvádí, že principem elektroejakulace je vyvolání erekčního reflexu s přerušovaným působením elektrického proudu. Při elektroejakulaci se elektrody zavádějí do rekta samců na úroveň měchýřkovitých žláz. Elektrody mohou být také navlečeny na prsty a přiloženy na kraniální okraj pánevního dna ve vyprázdněném konečniku. K zvýšení dráždivosti je třeba elektrodami pohybovat a provádět tak mírnou masáž. Elektrický proud vyvolává vlnité smršťování ampulí chámovodu, přídatných žláz, svalů konečniku a některých svalů pánve. Při elektroejakulaci vzniká elektroejakulační reflex bez sexuální stimulace, mnohdy i bez erekce. Průběh ejakulace je podmíněn přímým nebo nepřímým drážděním míchy a je pasivní. Celková doba elektrostimulace až po vyvolání ejakulace trvá včetně přestávek 2 – 4 min. K vyvolání ejakulace je potřeba 5 – 10 rytmických stimulací elektrickým proudem po dobu 5 sekund se stejně dlouhými pauzami. Objem ejakulátu získaný elektroejakulací je zpravidla vyšší než pomocí manuální ejakulace. V získaném ejakulátu nedochází ke změně koncentrace spermií ani není změněna jejich plodnost. Výjimku tvoří kozli, sperma získané elektroejakulací u nich má nižší hustotu než při manuální ejakulaci a často obsahuje moč.

Elektroejakulace je vhodná pro odběr semene od býků s poruchami pohlavního údu nebo s přechodným onemocněním končetin, od plemenářsky kvalitních beranů, kteří z důvodu poruchy nervové činnosti odmítají skákat a od mladých beránků při základních výběrech před zařazením do plemenitby (Kliment et al., 1989).

Elektrostimulace vyšších korýšů

Získávání a shromažďování spermatoforů se spermiemi může být velice užitečné a může rozšířit reprodukční techniky. Spermatofory mohou totiž posloužit k umělému

oplodnění samic, oplodnění *in vitro*. Jejich studium by mohlo vést k pochopení mechanismů při dlouhodobém skladování (Kooda-Cisco a Talbot, 1983).

Z důvodu výskytu problémů, jako jsou poruchy v páření krevet rodu *Penaeus* v zajetí, vyvinul Persyn (1977) metodu umělého oplodnění samic s otevřeným thelycem. Metoda spočívala v manuálním stlačení samčích orgánů na základě páteho páru pereopodů. Bohužel manuální ejakulace většinou poškodila distální část chámovodu a tak krevety sterilizovala pro další použití (Chamberlain et al., 1983).

O něco později Sandifer a Lynn (1980) popsali metodu elektrické ejakulace u sladkovodní krevety Rosenbergovy (*Macrobrachium rosenbergii*). Toto využití elektrostimulace demonstrovali také na jiných krevetách (*Palaemonetes pugio*, *P. vulgaris* a *Sicyonia ingentis*). Kooda-Cisco a Talbot (1983), tuto metodu úspěšně použili u humra amerického (*Homarus americanus*). Metoda elektrostimulace byla použita i na sladkovodním druhu raka, australském yabby (*Cherax destructor*), (Jerry, 2001). Tato technika vytlačování spermatoforů má několik výhod (Kooda-Cisco a Talbot, 1983):

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

Tato technika pomocí elektrického impulsu stimuluje svalstvo chámovodu, dokud nedojde k odezvě a vytlačení spermatoforů z gonoporů. Elektrická stimulace chámovodu nijak samce nepoškozuje a může být použita k získávání spermatu od stejného zvířete opakovaně (Kooda-Cisco a Talbot, 1983; Sandifer et al., 1984; Jerry, 2001) Ovšem použití silného elektrického proudu nebo příliš velkého počtu podnětů může způsobit vážné poškození zvířete vedoucí až k jeho úhynu (Sandifer et al., 1984).

Zařízení na elektrickou stimulaci, jak jej popisuje Sandifer et al. (1984), je složeno z elektrického transformátoru, reostatu, voltmetru a dvou elektrod. Elektrody byly umístěny na bázi páteho páru kráčivých nohou v oblasti kolem vývodů pohlavních

orgánů. Po přiložení elektrod k tělu samce byl vyvolán podnět a cyklus frekvence podnětů byl pomalu zvyšován.

Průběh a použité napětí se u každého druhu korýšů lišilo. Kooda-Cisco a Talbot (1983) využili metodu elektrostimulace k získání spermatoforů od humra amerického. Při jejich výzkumu bylo použito 65 samců, kteří byli vystaveni stimulu o napětí 12 V. Vytlačení spermatoforů bylo úspěšné celkem u 50 samců (77 %), kdy došlo k vytlačení spermatoforu alespoň z jednoho gonoporu.

Užitečnost elektrostimulace Sandifer et al. (1984) ověřili také u 18 krevet *Penaeus stylirostris* a 46 krevet *Penaeus vannamei* držných 7 – 10 měsíců v laboratoři a u 27 krevet *Penaeus setiferus* volně žijících v moři u texaského pobřeží. Dvanáct krevet *P. vannamei* a jedna kreveta *P. stylirostris* vykazovalo patologický stav charakterizovaný melanizací a tvrdnutím koncových ampulí a chámovodu, ostatní krevety byly zdravé. Krevety byly vystaveny napětí 4 – 6 V vždy na 1 – 2 vteřiny. Výsledkem elektrostimulace byla 80 % úspěšnost vytlačení spermatoforů z jednoho nebo obou gonoporů. V některých případech došlo jen k částečnému vytlačení spermatoforů, ty byly snadno zachyceny a odstraněny pinzetou. I přes rozdílnost životního prostředí druhů krevet, byly výsledky elektrostimulace podobné jak u krevet *P. stylirostris* (úspěšnost 82 %) a *P. vannamei* (úspěšnost 82 %) držných v zajetí, tak i u volně žijících krevet *P. setiferus* (úspěšnost 74 %).

Jerry (2001) popisuje experiment elektrického stimulu na 85 samcích australských sladkovodních raků yabby (*Cherax destructor*) a 15 intersexuálních jedinců (tj. jedinci s přítomností samčích i samičích pohlavních orgánů), obě skupiny byly dlouhodobě drženy v zajetí. Elektrostimulace probíhala při 5 a 10 mA. K vytlačení spermatoforů došlo, když cyklus frekvence byl mezi 40 – 60 Hz. Elektrický stimul byl aplikován nejvýš po dobu 10 sekund. Experiment byl úspěšný u 76 % (65 z 85) samců yabby, kdy spermatofory byly vytlačeny vždy z jednoho nebo obou gonoporů. Testování elektrostimulace na mezipohlavních jedincích dopadlo také pozitivně. Byly vytlačeny spermatofory v 73 % případů. Experiment poukázal na to, že zvířata mající mezipohlavní schopnost, mohou fungovat jako samci. Pro ověření produkce spermatoforů vlivem teploty bylo deset samců vystaveno elektrostimulaci v zimním období, kdy teplota vody klesla na 3,5 °C. K vytlačení spermatoforů došlo jen u jednoho samce. Ovšem po týdenní aklimatizaci v akváriu o teplotě 24 °C a zvýšení fotoperiody,

byl výsledek opačný a samci znovu vystavení elektrostimulaci vytlačili spermatofoxy v 90 % případů (9 z 10).

Sandifer et al. (1984) zjistili, že spermie získané elektroejakulací, mají normální morfologii a jsou zralé. Spermie byly použity k umělému oplození, po kterém nastal normální embryonální vývoj vajíček.

3.3. Reprodukce korýšů

3.3.1. Reprodukce krevet

Krevety patří, podobně jako raci, ke gonochoristům a vyskytují se v heterosexuálních párech. Objevují se však mezi nimi i hermafrodité (exempláře nejprve dozrávají jako samci a později se mění na plodné samice). Krevety čeledi Hippolytidae mohou být gonochoristé, ale i hermafrodité. Tyto krevety mění pohlaví ze samčího na samičí, ale vyskytují se také jako stálí samci a samice. U krevet druhu *Stenopus hispidus* byla potvrzena tvorba párů složených ze samce a samice. Krevety se mohou vizuálně vzájemně poznávat, pomocí čichu nebo hmatových receptorů. Čichový smysl u krevet posiluje motivaci námluv samice samečkem, zatímco vizuální kontakt motivaci snižuje (Calado, 2008).

Johnson (1977) zaznamenal rozdílné chování jedinců rodu *Stenopus*, v případě znovuspárování předchozími členy páru nebo jednotlivci, se kterými nedošlo k žádné předchozí interakci. Tento důkaz podporuje existenci individuálního poznávání, krevety jsou tak schopny rozpoznat předchozí vazby, i když je od nich dělí až 6 dní.

Zhang et al. (1998) popisuje chování krevet při páření. Samec pozoruje samici a dotýká se jí svými tykadly. Samci jsou lákáni pomocí feromonů vylučovaných exoskeletem samice. Pomocí chemoreceptorů na antenulách zjišťuje, zda je samice připravená k páření. Tento krok trvá od 10 minut do 6 hodin. Nutno zmínit, že na rozdíl od raků se toto děje za neustálého plavání. Poté samice vystaví tělo zdvihnutím abdomenu. Samec se přiblíží k samici a mění své chování. Posléze uchopí samici svými pereopody a po jejím uklidnění dochází k úspěšnému páření. Samec přikládá za pomoci gonopodů spermie uložené ve slizovém obalu na břišní stranu samice. Podobně jako endopody u samic se jedná o první dvojici pleopodů. Proces páření proběhne během cca 10 sekund. Po páření samec rychle samice opouští, to ovšem není pravidlem, např.

samci rodu *Macrobrachium* hlídají samici i po páření. Samice v příštích 15 až 25 minutách naklade vajíčka a dojde k jejich oplodnění. Samička začne vířit spermatofoxy, které se usazují na endopodech. Ovulovaná vajíčka tak procházejí přes první pár pleopod a během tření o endopody dochází k jejich oplodnění. Samice mohou ovulovat vajíčka i v případě, že nejsou přítomni samci, tato vajíčka však nejsou na plepodech uchycena dlouho. Některé druhy krevet se vyznačují vysokou plodností, např. samička *S. hispidus* je schopna inkubovat více než 2500 embryí (Calado, 2008).

3.3.2. Reprodukce humrů

Pohlaví humrů lze rozlišit dle prvního páru pleopod, které jsou u samců větší a mohutnější než u samic. Samice mají vaječníky umístěné podél hřbetu v hrudní dutině, v období pohlavní zralosti zabírají vaječníky většinu prostoru této dutiny. Vaječníky samic můžeme rozlišit podle jejich barvy na stupně připravenosti na páření až po ovulaci, (první stupeň – bílá, nezralé; druhý stupeň – zelená, zrání; třetí stupeň – tmavě zelená, plně zralé; čtvrtý stupeň – bílá, samice má zelená vajíčka; pátý stupeň – bílá, samice má hnědé zárodky, šestý stupeň – bílá, jsou uvolněna vajíčka). Pohlavní ústrojí samce je složeno z varlat a párových *vas deferens* (chámovody), které se nacházejí v hrudní dutině. Každé varle je složeno ze spletité trubice se semennými lobuly (lalůčky), ty utváří zrnitý vzhled gonád. Každý chámovod se rozpíná od hrudních rohů varlat, směrem k rozšířené a klikaté části chámovodu (ampula) a ústí na bázi pátého páru pereopodů, kde se nachází gonopory. U samců je možno podobně jako u samic odlišit různé stupně zrání, první stupeň – nezralé spermie; druhý stupeň – dozrávající spermie; třetí stupeň – zralé spermie; čtvrtý stupeň – vytlačené spermie (Cabiddu et al., 2008).

Páření humrů probíhá krátce po svlékání samice, kdy je její exoskeleton stále měkký. Samice vypouští speciální feromon, který způsobuje, že se samci stávají méně agresivní a začínají se sblížovat pomocí mechanoreceptorů na tykadlech. Proces páření pokračuje rituálem (tancem) se zavřenými klepety. Po rituálu samice zdvihne klepeta nad hlavohruď a tím oznamuje samci, že je připravená k páření. Samec poté obrací samici na záda a přilepuje pomocí prvních pleopod na její spodní stranu spermatofoxy se spermii. Samice může přilepené spermie nosit i po dobu 15 měsíců. Kladení a oplodnění vajíček probíhá většinou během července až srpna, samička rozpouští obal spermatorů, ovuluje vajíčka z vaječníků a promíchává je s uvolněnými spermii.

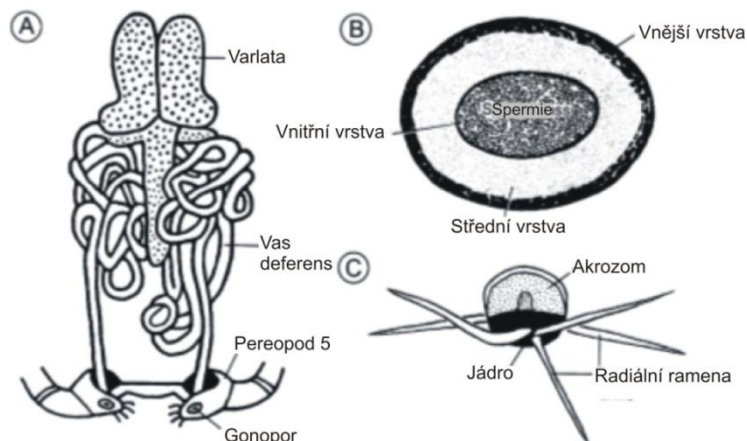
Oploďná vajíčka jsou uchycena na pleopodech samice kde se inkubují. Doba inkubace trvá cca 10 až 11 měsíců a naupliové larvy humrů se líhnou v období května a června. Vylíhli jedinci opouštějí samici (Mente et al., 2009).

3.3.3. Reprodukce a pohlavní soustava raků

Raci jsou gonochoristé, tedy odděleného pohlaví. U raků se vyskytují i mezipohlavní jedinci vyznačující se samčími i samičími znaky a objevují se pravidelně v nízkých frekvencích u mnoha druhů. Funkční hermafroditismus je však u raků velmi vzácný (Rudolph, 1995a, b). Pohlavní orgány, varlata nebo vaječníky, jsou uloženy v dutině hlavohruďi mezi spodinou srdeční dutiny a žaludkem. Jejich velikost a vzhled je závislý na věku a reprodukční kondici jedince. V období reprodukce se vnitřní reprodukční orgány přízračně zvětšují. U samců dostávají varlata mléčnou barvu v důsledku produkce spermií. Vaječníky se začínají plnit žlutavě – hnědými oocyty (Vogt, 2002).

Samčí pohlavní orgány

Varlata jsou místem spermatogeneze a spermiogeneze. Ze spermatogonií se během prvního a druhého meiotického dělení vyvíjejí spermatocyty a spermatidy. U čeledi Astacidae, kam patří všechny evropské druhy raků, ale i američtí raci rodu *Pacifastacus*, se varlata skládají z párových předních laloků a protáhlého nepárového zadního laloku (Obr. 1). Samčí pohlavní orgány raků jsou pokryty vnějším spojovacím vazivem a jsou složeny z mnoha semenotvorných tubulů, které obsahují Sertoliho buňky a různá vývojová stádia zárodečných buněk. V semenotvorných tubulech varlat probíhá synchronně spermatogeneze (vývoj finálních spermatid ze spermatogonií) a spermiogeneze (vývoj spermatozoí ze spermatid). V jednom semenotvorném kanálku můžeme nalézt 1 – 2 vývojová stádia, ale ta mohou být odlišná od stádií v sousedních semenotvorných tubulech. Semenotvorné tubuly se z obou stran varlat slučují do sběrných kanálků, na které navazují do klubíčka stočené vývodné pohlavní cesty – chámovody (*vas deferens*) a ústí na bázi (přesněji na koxálním článku) páteho páru kráčivých nohou (pereopodech). V chámovodech dochází k formování a balení spermatozoí do spermatoforů, které hrají roli při přenosu spermatu ze samečka k samici při páření (Vogt, 2002).



A – celkový pohled na samčí pohlavní orgány; B – průřez spermatoforem ve vývodných pohlavních cestách; C – uvolněná spermatozoa s dlouhými radiálními rameny

Obr. 1 – Pohlavní soustava samce (A – Holdich a Reeve, 1988; B, C – Dudenhausen a Talbot, 1983).

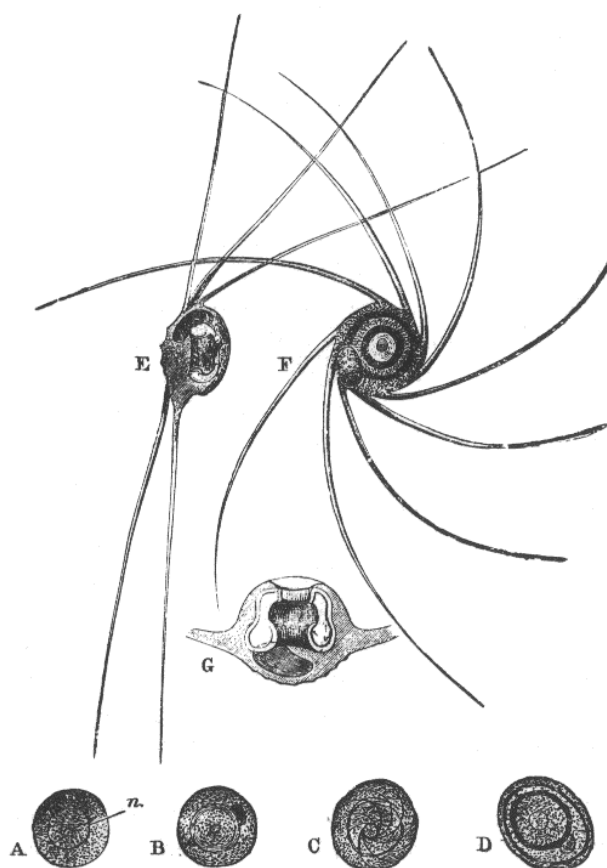
Ve zralých varlatech se spermatogonie mitoticky dělí. Následně vstupují do meiózy, čímž prodělávají vývoj z primárních a sekundárních spermatocytů na spermaticy. Během spermiogeneze se spermaticy přeměňují na spermatozoa formováním akrozomu a radiálních ramen, dále dochází k přeměně jader a za pomoci Sertoliho buněk dochází ke vstřebávání přebytečné cytoplazmy. Existují důkazy, že tento typ buněk má význam i v produkci a sekreci mukopolysacharidů, které obklopují každou spermii (Moses, 1961).

Spermatofory a spermie

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

Spermatofory mají jednoduchý cylindrický tvar s délkou 4 – 9 mm a s průměrem do 1 mm. U raků čeledi Astacidae samec při páření vytlačené spermatofory přilepí dozadu na ventrální (spodní) stranu hlavohrudi samice. Zatímco samice raků čeledi Cambaridae mají na zadních sternitech (sklerotizované destičky na břišní straně tělních článků členovců) hlavohrudi semennou schránku (*annulus ventralis*). Při páření umístí samec spermatofory do této schránky. Proto je velmi obtížné u této čeledě raků rozpoznat spářenou samici od nespářené. Obal přilepeného spermatoforu ve vodě rychle tvrdne. Spermatofory jsou na těle samice dobře viditelné i po několik týdnů. Obal spermatoforů je odolný proti vlivům životního prostředí a chrání tak spermie po delší časový odstup mezi pářením a ovulací vajíček (Vogt, 2002).

Spermie raka má průměrnou velikost 0,015 mm (Obr. 2). Račí spermie nepotřebují v samičím traktu plavat na dlouhé vzdálenosti jako tomu je u ostatních zvířat s vnitřním oplodněním nebo ve vodním prostředí u zvířat s vnějším oplodněním. Proto spermie postrádají klasický bičík a jsou víceméně nepohyblivé (Poljaroen et al., 2010). Oproti tomu jsou spermie kromě složitého akrozomu a jádra vybaveny také radiálními rameny, která tvoří zvětšené jádro a svazek mikrotubulů. Radiální ramena se vyskytují u spermii čeledí Astacidae a Cambaridae, ale chybí u raka *Cherax tenuimanus* a *Cherax albidus* (Beach a Talbot, 1987). Počet těchto ramen je druhově specifický. Moses (1961) uvádí 4 radiální ramena u raka červeného (*Procambarus clarkii*), ale například u raka říčního (*Astacus astacus*) je jich více než dvacet. V chámovodech jsou radiální ramena pevně omotaná kolem spermie. Spermie je i s rameny obalena pouzdrém. Tato pouzdra omezují radiální ramena a umožňují tak těsnější obalování spermii ve spermatoforech (Dudenhausen a Talbot, 1983).



Obr. 2 – Spermie raka (Huxley, 1879).

Hroty (radiální ramena) spermíí u raka říčního jsou tvořeny z jader a jsou umístěny na středu spermie. Na základě těchto struktur můžeme pozorovat početné mikrotubuly a vlákna. Při bližším zkoumání těla gamet lze pozorovat pouze mikrotubuly a jaderné a plazmatické membrány, které se téměř dotýkají vnější membrány jádra. V každém hrotu spermie se může nacházet asi 30 až 40 mikrotubulů. Velikost každého mikrotubulu se pohybuje mezi 180 a 200 pm. Tloušťka těchto hrotů se pohybuje mezi 0,3 a 0,4 μm v nejbližším konci. Na některých fotografiích hrotu spermie se zdá, že se některé mikrotubuly v hrotu spojují (López – Camps et al., 1981).

Podle Talbota a Summerse (1978) není základní funkce radiálních ramen zcela objasněna. Výplň hrotu radiálních ramen je nejspíše druh kontraktilní bílkoviny, jako je aktin či jiný cytoskeletární protein s depolymerizační nebo polymerizační funkcí (Pongtippatee et al., 2007).

López – Camps et al. (1981) popsal akrozomální oblast spermie u raka říčního. Ta je složena z váčku, u kterého je směr otevírání orientován k jádru. Akrozom můžeme rozdělit do dvou rozdílných částí:

- ztluštělé puchýřky s tvarovanými těly připomínající přilby, skládají se ze tří podčástí (kruh připomínající tlustou koblíhu, apikální komplex a beztvář matrix)
- centrální kanálek, který je omezen rozevíráním váčku

Společně tyto součásti tvoří akrozomu jako kulatou organelu, jejíž největší průměr se pohybuje od 11 do 14 μm , přičemž nejmenší průměr se pohybuje od 5 do 8 μm (López – Camps et al., 1981).

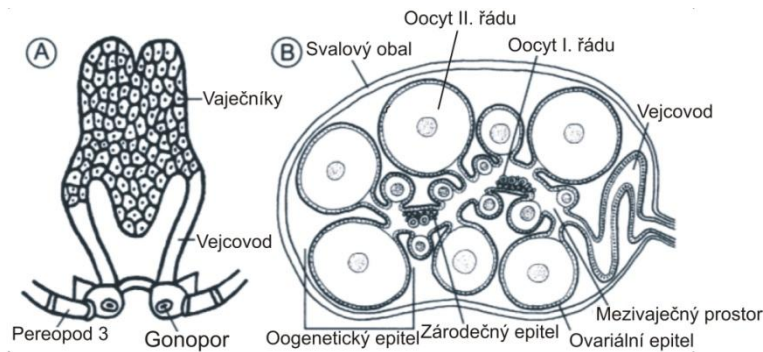
Během kladení vajíček, kdy jsou spermie uvolněny ze spermatoforu, se pouzdra kolem spermií rozpouštějí a radiální ramena se rozevírají. Pomocí radiálních ramen se okamžitě připojuje spermie k vajíčku, aby mohlo dojít k přesunutí akrozomu a přímému kontaktu s povrchem vajíčka. Během kontaktu spermie s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

Samičí pohlavní orgány

Vaječníky jsou vakovitého tvaru a trochu se podobají jetelovému lístku. Jejich barva a velikost se mění v závislosti na vývoji vajíček. V době pohlavního klidu jsou vaječníky bělavé, v období zrání vajíček se zbarvení mění na červenohnědé. Ando a Makioka (1998) popisují vaječník jako trojlaločný orgán. Vaječníky se skládají ze dvou předních a jednoho zadního vaku, ty jsou obalené tenkým svalovým pláštěm (Obr. 3). Tyto vaky jsou utvořeny pomocí ovariálního epitelu, který je zahnutý dovnitř a vytváří mnoho oogenetických váčků. Každý tento váček obsahuje jeden oocyt I. nebo II. řádu. Zárodečný epitel (germarium) je soustředěn ve středu vaječnicků a je spojen s vaječnickovým epitelem. Zárodečný epitel obsahuje oogonie, malé oocyty I. řádu a somatické intersticiální buňky. Zárodečný epitel produkuje oogonie po celou dobu reprodukčního cyklu samice (Vogt, 2002).

Podle Krola et al. (1992) není oogeneze u raků ještě zcela vyjasněna ve všech detailech a popis tohoto procesu se odvíjí z dostupných informací o oogenezi u řádu desetinožců (Decapoda). Z oogonií se ve folikulech vyvíjejí a rostou oocyty I. řádu.

Toto stádium opouští zárodečný epitel ve velikosti 30 – 50 µm a formuje vaječnickový epitel do nového oogenetického vaku. Zde se oocyt usazuje a začíná meiotické dělení (Abdu et al., 2000). Oocyty zde probíhají různými fázemi až do sekundárního dělení ve velikosti 400 µm, které je charakterizováno masivním ukládáním žloutku v cytoplasmě (Vogt, 2002).



A – celkový pohled na samičí pohlavní ústrojí; B – řez ventrálním vaječnickovým vakem u raka *Procambarus clarkii*

Obr. 3 – Pohlavní soustava samice (A – Holdich a Reeve, 1988; B – Ando a Makioka, 1998).

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

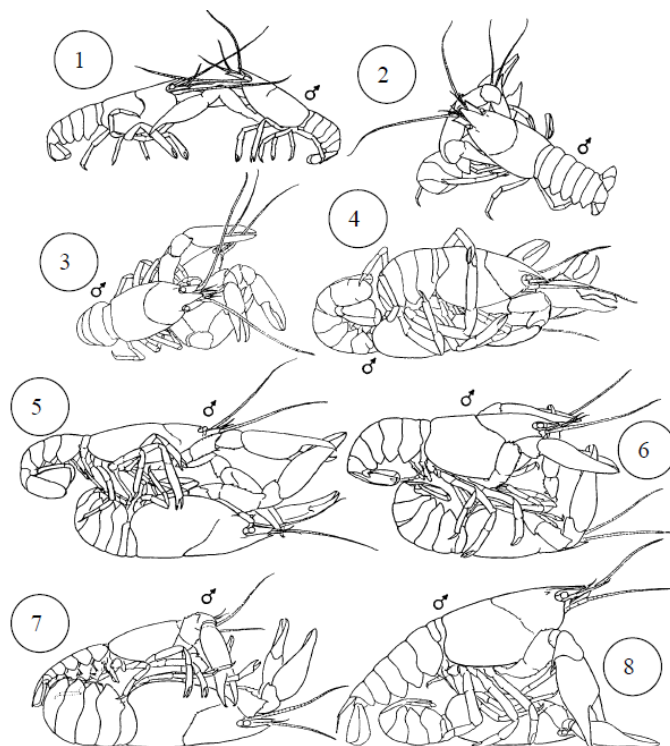
Páření raků

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

K páření raků v našich klimatických podmínkách dochází na podzim, avšak u raka pruhovaného bylo zjištěno i druhé, jarní, páření, ke kterému dochází v březnu až dubnu (Hamr, 2002). Délka reprodukčního cyklu závisí na podmínkách lokalit, v nichž se raci nachází. Páření raků je hormonálně řízeno a regulováno, začíná s poklesem teploty vody a se zkracující se fotoperiodou v podzimním období. Páření není přesně vázáno na určitou teplotu nebo na určitý termín, ale vyšší teplota vody může reprodukční sezónu raků oddálit. Pro začátek páření raků je důležitá i fotoperioda, ale v oblastech s mírným podnebným pásmem je teplota vody hlavním stimulem. Fotoperioda páření ovlivňuje jen nepřímo. Vedle těchto podmínek má na průběh páření významný vliv i individuální proces svlékání krunýře jednotlivých raků. Proto se nepáří všichni raci v populaci najednou, ale dochází k postupnému páření připravených jedinců (Skurdal a Taugbøl, 2002). Neopomenutelný je samozřejmě i vliv feromonů na iniciaci páření (Ingle, 1977).

Pohlavně dospělí samci a samice se v podzimním období vyznačují zvýšenou aktivitou i v průběhu dne. Vnější pohlavní orgány (gonopody) samců i samic v tomto období bělají a duří. Žlázy po stranách zadečku (abdomenu) u samic, které při uvolňování oocytů produkují sliz, se v tomto období výrazně vyvíjejí a bělají (Kozák et al., 2008).

U raků probíhá vnější oplodnění. V období páření samec sleduje samici, přechází s ní do přímého kontaktu, pevně ji uchopí klepety, obrátí ji na hřbet a stlačuje její klepeta ke dnu. Při páření samec vytlačuje spermatofory se spermatem z ústí pohlavních cest na bázi 5. páru pereopodů (Obr. 4). Vytlačené spermatofory jsou samcem pomocí gonopodů umístěny a přilepovány na ventrální (spodní) stranu samice v blízkosti vývodů jejích pohlavních cest nebo u čeledi Cambaridae do tzv. *annulus ventralis*. Obal spermatoforů ve vodě rychle tvrdne (Skurdal a Taugbøl, 2002).



Obr. 4 – Průběh páření raků (Pöckl, 1999)

Ovulace a oplodnění vajíček

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

Ke kladení vajíček samicí dochází především v nočních hodinách a trvá 2 až 3 hodiny. Samice se musí nejprve na kladení důkladně připravit. Samička raka stočí zadní část abdomenu pod přední část a vytvoří téměř uzavřenou dutinu. Krátce před kladením vajíček začínají slizové žlázy, umístěné na abdomenu samic, produkovat sliz. Zralé oocyty se hromadí v distální části vaječníků a jsou při kladení uvolňovány z vývodů pohlavních cest. Uvolněné oocyty se při rytmickém pohybu samičího abdomenu mísí se slizem, který rozpouští ztvrdlé obaly spermatoforů připevněných na ventrální straně samice u vývodů pohlavních cest (u čeledi Cambaridae tzv. *annulus ventralis*) a uvolňuje spermie, připravené k oplození vajíček. Když je masa spermií uvolněna ze

spermatoforu během ovulace vajíček, obal spermatoforů se rozpouští a radiální ramena se roztáhnou. Pomocí nich se přichytí spermie na vajíčka a umožní přímý kontakt akrozomu s povrchem vajíčka. Oplodněná vajíčka jsou poté pomocí produktů žláz (*glair glands*) na abdomenu samic přichycena na pleopody. Na pleopodách samic probíhá až do léta inkubace vajíček a následné líhnutí ráčat (Vogt, 2002).

3.3.4. Životní cyklus raků

Rak říční (*Astacus astacus*)

Reprodukční období raka říčního je charakteristické pro měsíc říjen. Během období páření dochází ke zvětšení a zblednutí gonopodů u samců. U samic nastává mléčné zabarvení vejcovodů a žláz (*glair glands*) na okrajích abdomenu (Skurdal a Taugbøl, 2002).

Při páření samec přilepuje bílé spermatofory na sternum samice mezi druhým a čtvrtým párem kráčivých noh. Samec se může pářit s více samicemi. Doba páření trvá obvykle 2 až 3 týdny. Ovulace a oplodnění vajíček nastává do několika hodin, ale může k tomu dojít i do 6 týdnů po páření (Vogt, 2002).

Po oplodnění vajíček nastává jejich inkubace, během ní může dojít ke ztrátám na vajíčkách (špatné oplození vajíček, nedostatečné uchycení na pleopodech, predace ryb nebo zaplísnění vajíček apod.). Inkubace vajíček trvá přibližně 8 měsíců, u raka říčního jako všech druhů raků je inkubace ovlivněna teplotou vody (Skurdal a Taugbøl, 2002). Hessen et al. (1987) předpokládají, že zvýšením teploty může být délka inkubace snížena z 1900 na 1300 denních stupňů.

K líhnutí ráčat dochází zpravidla v průběhu června. Nejprve jsou vylíhlá ráčata pevně přichycena k tělu samice ještě po několik dní a jsou nepohyblivá. Během prvního svlékání dochází ke změně morfologie ráčat a již nejsou pevně spojeny se samicí. Po několika dnech se ráčata začínají volně pohybovat (Skurdal a Taugbøl, 2002).

Životní cyklus raků je propojen s procesem svlékání, kdy raci svlékají chitinový krunýř a vytváří si krunýř nový. Raci tak během tohoto svlékání skokově rostou. Frekvence procesu svlékání klesá se zvyšujícím se věkem. Samci raka říčního dosahují pohlavní dospělosti ve věku 3 let, zatímco samice ve věku 3 – 5 let při velikosti 70 – 80 mm (Skurdal a Taugbøl, 2002).

Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

Rak signální pohlavně dospívá ve věku 2 až 3 let při velikosti 60 – 90 mm. Samci raka signálního rostou mnohem rychleji než samice, proto mohou pohlavně dospět i o rok dříve. Páření raka signálního nastává v průběhu října. Proces páření a oplodnění vajíček je u raka signálního velmi podobný jako u raka říčního. Samice raka signálního disponují velkou plodností pohybující se v rozmezí 200 až 500 vajíček v závislosti na velikosti samice. Inkubace vajíček trvá 7 až 9 měsíců, v přepočtu se jedná o rozmezí od 1500 do 2200 denních stupňů. Většinou se čas inkubace pohybuje okolo 1900 denních stupňů. Ráčata se líhnou od května do července v závislosti na teplotě vody a po odpojení se od matky se volně pohybují (Lewis, 2002). Příloha č. 1.

Rak červený (*Procambarus clarkii*)

Mezi sekundární znaky pohlavně zralých samců patří nápadné kopulační háčky na bázi třetího a čtvrtého páru kráčivých nohou, zduřelé gonopody a zvětšená klepeta. Pohlavně dospělí samci raka červeného se označují jako první forma (forma I). U těchto raků jsou klepeta mnohem větší než u nedospělých a sexuálně neaktivních raků druhé formy (forma II). U samic raka červeného zahrnujeme mezi sekundární pohlavní znaky zvětšená klepeta, robustnější zadeček a výrazný annulus ventralis mezi bázemi pereopodů. Sexuálně aktivní rak červený se páří kdykoliv dojde ke kontaktu s vnímavým partnerem (Huner, 2002).

Po několika týdnech až měsících po páření probíhá kladení a oplodnění vajíček. Jejich embryonální vývoj je ovlivněn teplotou vody a při teplotě 22°C probíhá během 2 až 3 týdnů, při poklesu teploty vody pod 10 °C je vývoj zpomalen nebo může být i zastaven. Po vylíhnutí se ráčata po 2 až 3 týdny dvakrát svlékají, než jsou schopni opustit samici. Ovšem i po osamostatnění a oddělení se od samice se ráčata stále zdržují v její blízkosti (ráčata přitahuje k sobě produkci feromonů). Mladí jedinci se zdržují u samice do té doby, než začne opět zalézat do nory nebo úkrytu (Huner, 2002).

Huner a Avault (1976) uvádí, že pro dosažení pohlavní zralosti je u raka červeného zapotřebí nejméně 11 svlékání (období mezi svlékáním trvá 6 – 30 dní v závislosti na teplotě vody). Po určité době dojde k ukončení sexuální aktivity samců a přeživší samci se svléknou do pohlavně neaktivní růstové formy II. Není zatím zcela jasné, zda podobným procesem procházejí i samice (Huner, 2002).

Rak červený dokáže zplodit až dvě generace potomstva za rok, zejména v nižších zeměpisných výškách. Velikost pohlavně dospělých jedinců je velmi rozdílná, pohlavní dospělosti mohou jedinci dosáhnout již ve velikosti 45 mm, ale také až při velikosti 125 mm. Životní prostředí zde hraje velkou roli v dozrávání jedinců (Huner, 2002).

Počet vajíček je ovlivněn velikostí samice, plodnost dosahuje při celkové délce samice 60 mm okolo 50 vajíček, u 90 mm dlouhé samice je to už 300 vajíček a 120 mm samice může ovulovat více než 600 vajíček. Délka života raka červeného je poměrně krátká, v přírodě se dožívá přibližně asi jen 12 – 18 měsíců a v laboratorních podmínkách byl dosažen věk 4 let (Huner, 2002). Příloha č. 2.

Rak pruhovaný (*Orconectes limosus*)

První páření probíhá u raka pruhovaného v září až říjnu. Pro tento druh je však ještě charakteristické druhé páření na jaře (březen až duben). Rak pruhovaný dosahuje pohlavní zralosti již ve druhém roce života. Sbližování a páření tohoto druhu je velmi podobné rodu *Astacus* s výjimkou, že během páření ukládá samec spermatofory do *annulus ventralis* na spodní straně samice. Vajíčka nejsou kladena ihned na podzim, ale až na jaře na konci května po druhém páření. Takto nedochází k zastavení vývoje (diapauze) embryí během zimního období. Průměrná plodnost samic raka pruhovaného je 300 vajíček s velkým rozmezím daným velikostí samice. K líhnutí ráčat dochází již koncem června. Ráčata se zdržují v okolí matky i poté co už nejsou k samici připojena. Rak pruhovaný se dožívá přibližně 4 let a velikosti okolo 60 mm (Hamr, 2002). Příloha č. 3.

Cherax destructor

Cherax destructor patří mezi australské raky, tomuto druhu se také přezdívá „yabby“ (odvozeno od domorodých názvů). Pohlaví u *C. destructor* můžeme rozlišit podle vnějších znaků. Samice mají umístěny na základě třetího páru pereopodů vývody

vejcovodů, zatímco u samců se pohlavní vývody nachází na základě pátého páru pereopodů (Lawrence a Morrissy, 2000).

Páření druhu *C. destructor* probíhá v letních měsících. Páření i vývoji vajíček vyhovuje delší den i vyšší teplota vody. Při zvýšení teploty nad 15 °C může začít páření již na začátku jara až do poloviny léta. V případě kulminace teploty v rozmezí 18 až 20 °C a denní periodou alespoň čtrnácti hodin, je *C. destructor* schopen reprodukce až pětkrát za rok. Během páření vkládá samec spermatofoxy na spodní stranu samice mezi čtvrtý a pátý pár kráčivých nohou, samička vytlačuje vajíčka, promíchává je se spermiemi a uchycuje na pleopody na abdomenu. K líhnutí dochází po 19 až 40 dnech v závislosti na teplotě vody. Plodnost samice je závislá na její velikosti, obvykle se snůška pohybuje mezi 30 až 450 vajíčky, ale může dosáhnout až 1200 vajíček. Vylíhlá ráčata jsou u samice jen do doby, než se osamostatní. *Cherax destructor* může dosáhnout pohlavní dospělosti již v prvním roce života (Lawrence a Jones, 2002).

4. Materiál a metodika

4.1. Zařízení

K vyvolání elektrického stimulu byl použit přístroj zakoupený u firmy Diametral, jednalo se o přístroj AC250K2D (Obr. 5). Tento transformátor je řízen procesorem a jedná se o zdroj střídavého napětí. Jeho originální uplatnění je v napájení různých zařízení střídavým napětím 0V÷255V/2A. Zařízení je určeno především pro vývojové techniky, opraváře spotřební elektroniky, výrobní podniky a také pro odborné školy.

Výstupní napětí přístroje se získává přeměnou síťového napětí 230V/50Hz odděleným transformátorem. Díky tomu má výstupní napětí čistý sinusový průběh 50Hz. Minimální změna napětí u tohoto přístroje je 1V. Ovládání zdroje je jednoduché a provádí se pomocí klávesnice umístěné na čelním panelu přístroje. Zde se nastavovalo a potvrdzovalo potřebné napětí k elektrostimulaci. Zdroj je vybaven rozhraním RS232 a pomocí dodaného softwaru D-controlAC1, lze zdroj ovládat i pomocí počítače. Pomocí D-View AC1, lze neomezeně definovat procesy závislé na čase a napětí. Tyto funkce nebyly ale v tomto případě využity. Nastavená a změřená hodnota napětí se zobrazuje na samostatných třímístných displejích LED na čele panelu přístroje. Zařízení na střídavý proud bylo pro úspěšnost pokusů elektrostimulace vybaveno dvěma elektrodami, které byly k přístroji připojené.

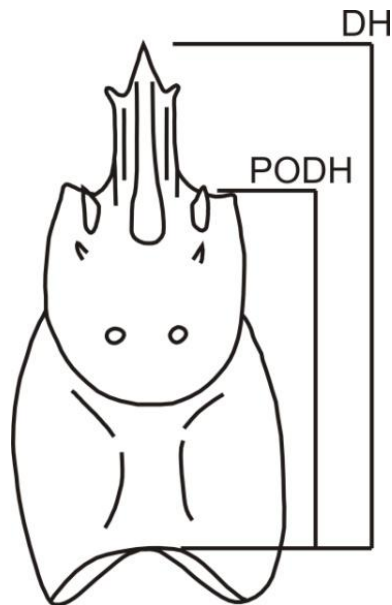


Obr. 5 – Přístroj AC250K2D.

4.2. Postup experimentů

Všechny experimenty elektrostimulace u raků byly prováděny na experimentálním rybochovném zařízení, které je součástí VÚRH ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod JU v Českých Budějovicích. Postup byl u všech experimentů podobný, výjimku tvořilo pouze různé použité napětí k elektrostimulaci. Po vyjmutí raků z chovných nádrží nebo akvárií, kde byli drženi, byli samci přeneseni ve vaničce s vodou (se stejnou teplotou vody jako v nádrži) do laboratoře. V laboratoři byla připravena druhá vanička (kbelík) se stejnou vodou, na odkládání raků po elektrostimulaci.

Samci byli před elektrostimulací nejprve změřeni. Měřila se délka a hmotnost každého jedince. Délka se měřila pomocí posuvného měřidla s přesností na dvě desetinná místa. Nejprve se změřila délka hlavohruď (měří se od začátku rostra až po konec hlavohruď, Obr. 6) a poté postorbitální délka hlavohruď (měří se od oční jamky až po konec hlavohruď, Obr. 6). Hmotnost raka byla zjišťována pomocí vah s přesností na desetiny gramu. U každého raka se zapisovala také případná ztráta klepet při svlékání krunýře nebo vlivem mechanického poškození či agresivitou jiných samců.



DH – délka hlavohruď; PODH – postorbitální délka hlavohruď

Obr. 6 – Perokresba krunýře raka signálního s rozměry.

Po měření byl proveden vlastní experiment zaměřený na vypuzení spermatoforů pomocí transformátoru na střídavý proud a dvojice elektrod. Jeden pracovník vždy

fixoval raka tak, aby zpřístupnil ventrální stranu samce. Druhý pracovník pak obsluhoval zařízení na střídavý proud a dvojici elektrod (Příloha č. 5). V případě, že by nebyl dostupný pracovník, který by fixoval samce během prováděného experimentu, je zde možnost samce bezpečně zafixovat dorsální stranou k desce stolu.

Zařízení na střídavý proud bylo pomocí ovládací klávesnice na přístroji nastaveno na požadované napětí a elektrody se přiložily na bázi pátého páru kráčivých nohou samců v oblasti gonoporů (Obr. 7). Je zapotřebí, aby se elektrody dotýkaly citlivé části samce, když dochází ke stimulu. Pokud by byla jedna nebo obě elektrody umístěny na chitinovém krunýři raka, nebude mít elektrostimulace daný účinek. K elektrickému stimulu byly vyzkoušeny různé techniky, např. přidržení, poklepávání nebo kroužení elektrod na bázi pátého páru kráčivých nohou. V případě, že při daném napětí elektrického stimulu nedošlo k žádné odezvě, bylo použité napětí zvýšeno (samozřejmě s ohledem na raky, aby nedošlo k porušení tkáně v oblasti gonoporů nebo narušení biologických funkcí raků).



Obr. 7 – Přiložené elektrody k základu pátého páru pereopodů.

V případě, že došlo ke kladnému výsledku elektrostimulace a samec vlivem elektrického stimulu vytlačil spermatofoxy z gonoporů, byla elektrostimulace okamžitě přerušena a vytlačené spermatofoxy byly odebrány pomocí pinzety a vloženy do plastové zkumavky. Proces elektrostimulace se poté znovu opakoval. Všechny druhy raků byly vystaveny elektrickému stimulu jen v daný den experimentu, u raků tak neprobíhala elektrostimulace opakovaně v jiných dnech.

Většina vzorků spermatoforů se spermii byla odborně za pomoci ochranných prostředků zafixována 4% glutaraldehydem. Tyto vzorky byly určeny ke zpracování a vyšetření v laboratoři elektronové mikroskopie. Zde se posuzoval stav spermií s ohledem na jejich možné poškození při elektrostimulaci a dále sloužily k dalším studiím zaměřeným na detailní strukturu spermií u jednotlivých raků (součást navazující doktorské práce). Část vzorků byla vyšetřena pod mikroskopem, zdali jsou spermie aktivní.

4.3. Design experimentů

Experiment č. 1 – rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

Na podzim roku 2008 byli z rybníka v Čáslavicích přivezeni samci raka signálního do laboratoře rybochovného zařízení VÚRH Vodňany. Raci byli umístěni a dlouhodobě drženi v retenční nádrži s průtočným systémem. Teplota vody v nádrži kolísala podle klimatických podmínek prostředí. Dne 12. ledna 2011 bylo odebráno 15 samců raka signálního k prvnímu experimentu. Raci byli odloveni z nádrže o teplotě vody 0,2 °C a přeneseni do laboratoře. Každý samec raka signálního byl jednotlivě měřen a vážen (viz Tab. 1). K elektrostimulaci bylo použito napětí 10 V, v případě negativní odezvy bylo zvýšeno na 20 V.

Tab. 1: Biometrika raka signálního zařazeného do experimentu č. 1.

Číslo raka	DH (mm)	PODH (mm)	V (g)	Klepeta	
				L	P
1	49,41	36,43	30,5	-	+
2	37,46	27,92	15,6	+	+
3	37,27	28,88	15,3	+	+
4	39,77	30,06	16,5	-	+
5	34,93	26,24	12,6	+	+
6	47,34	36,04	31,1	+	+
7	41,96	30,71	17,6	-	+
8	36,61	28,11	15,2	+	+
9	36,86	28,11	14,1	+	+
10	51,87	38,89	44,4	+	+
11	42,97	33,74	23,3	+	+
12	37,78	28,28	15,8	+	+
13	36,53	29,27	15,9	+	+
14	35,57	27,15	12,4	+	+
15	35,14	26,31	11,3	+	+

DH – délka těla od začátku rostra až po konec hlavohrudi v milimetrech; **PODH** – délka hlavohrudi měřená od oční jamky po konec hlavohrudi v milimetrech; **V** – váha v gramech; **L** – levé klepeta; **P** – pravé klepeta; + – přítomné; - – nepřítomné

Experiment č. 2 – rak pruhovaný (*Orconectes limosus*)

Další experiment elektrostimulace na racích proběhl 21. března 2011. Jednalo se o 10 jedinců raka pruhovaného, kteří byli odchyceni studenty FROV na Zlaté Stoce na Třeboňsku a převezeni do laboratoře rybochovného zařízení ve VÚRH Vodňany. Raci byli drženi v laboratoři pouze krátce, neboť byli přivezeni cca 7 dní před experimentem. U raků byla měřena pouze postorbitální délka hlavohrudi a hmotnost (viz Tab. 2). Elektrostimulace každého jedince probíhala nejprve při napětí 10 V, při negativním výsledku bylo napětí zvýšeno na 20 V.

Tab. 2: Biometrika raka pruhovaného zařazeného do experimentu č. 2.

Číslo raka	PODH (mm)	V (g)	Klepeta	
			L	P
1	24,60	10,7	+	+
2	24,17	10,6	+	+
3	24,33	10,3	+	+
4	24,13	9,9	+	+
5	22,77	8,4	+	-
6	22,58	8,7	+	-
7	22,76	9,6	+	+
8	22,51	8,8	+	+
9	20,30	7,1	-	+
10	21,31	7,3	+	+

PODH – délka hlavohrudi měřená od oční jamky po konec hlavohrudi v milimetrech; **V** – váha v gramech; **L** – levé klepeta; **P** – pravé klepeta; + – přítomné; - – nepřítomné

Experiment č. 3 – rak červený (*Procambarus clarkii*)

Dne 8. června 2011 byl proveden další experiment, tentokrát na druhu raka červeného zakoupeného u společnosti GIGA EXOTIC a dopraveného ze Singapuru. Jednalo se o 36 samců. Raci byli drženi, asi měsíc před experimentem, v akváriích s recirkulačním systémem. Teplota vody během experimentu není registrována, ale v akváriích se udržovala teplota vody v rozmezí od 20 do 25 °C. Raci byli po vylovení z akvárií velmi agresivní ve srovnání s předchozími druhy, což je u tohoto druhu typické. I zde byl postup měření (viz Tab. 3) a experimentu stejný, výjimku tvořilo pouze použité napětí. Nejprve bylo použito napětí 10 V, jako u ostatních experimentů, při negativním výsledku bylo napětí zvýšeno na 15 V.

Tab. 3: Biometrika raka červeného zařazeného do experimentu č. 3.

Číslo raka	DH (mm)	PODH (mm)	V (g)	Klepeto	
				L	P
1	43,17	34,28	25,8	+	+
2	39,99	31,65	19,6	+	+
3	40,32	32,06	18,2	+	+
4	38,30	30,79	14,4	+	+
5	38,39	29,08	14,0	+	+
6	37,58	29,92	13,8	+	-
7	37,10	29,67	13,0	+	+
8	38,49	30,93	14,4	+	+
9	31,41	24,74	9,4	+	+
10	40,50	31,63	22,2	+	+
11	42,48	33,35	24,7	+	+
12	37,87	30,47	14,4	-	+
13	39,07	31,40	15,1	+	+
14	38,62	29,69	11,9	+	-
15	32,09	25,41	9,9	+	+
16	31,56	23,46	8,6	+	+
17	44,18	35,14	24,3	+	+
18	42,39	34,18	23,6	+	+
19	42,26	32,99	22,3	+	+
20	41,82	32,35	21,0	+	+
21	41,40	32,97	22,7	+	+
22	40,53	32,02	22,5	+	+
23	39,68	31,02	18,7	+	+
24	41,45	32,27	20,9	+	+
25	39,14	31,40	19,0	+	+
26	42,32	32,99	21,0	+	+
27	31,30	24,80	8,6	+	+
28	29,42	23,41	7,7	+	+
29	41,22	23,30	13,9	-	+
30	43,22	23,98	18,5	+	+
31	38,85	30,27	15,6	-	+
32	38,28	30,11	18,1	+	+
33	32,55	26,25	10,7	+	+
34	39,39	30,18	14,3	+	+
35	31,90	25,21	9,3	+	+
36	37,83	30,07	13,5	+	+

DH – délka těla od začátku rostra až po konec hlavohrudi v milimetrech; **PODH** – délka hlavohrudi měřená od oční jamky po konec hlavohrudi v milimetrech; **V** – váha v gramech; **L** – levé klepeto; **P** – pravé klepeto; + – přítomné; - – nepřítomné

Experiment č. 4 – rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

Poslední experiment s elektrostimulací proběhl 28. října 2011, opět na experimentálním rybochovném zařízení ve Vodňanech. Raci byli přivezeni z přírodní lokality (potok Babačka, poblíž Velkého Meziříčí) v období páření raků. Raci byli drženi v laboratoři jen krátce při teplotě vody 8 °C. Při experimentu bylo měřeno (viz Tab. 4) a testováno celkem 12 jedinců raka signálního. Samci byli rozděleni na dvě skupiny po šesti jedincích, přičemž na prvních šesti racích byla provedena elektrostimulace při napětí 10 V a druhá polovina (zbylých šest raků) byla vystavena napětí 15 V.

Tab. 4: Biometrika raka signálního zařazeného do experimentu č. 4.

Číslo raka	DH (mm)	PODH(mm)	V (g)	Klepeto	
				L	P
1	50,0	40,5	51,6	+	+
2	49,0	38,5	43,8	+	+
3	48,5	38,5	34,9	-	+
4	52,0	41,0	49,9	+	+
5	ZR	36,0	32,2	+	+
6	41,0	32,0	23,6	+	+
7	61,5	47,0	80,8	+	+
8	51,5	41,0	43,3	+	+
9	57,0	45,0	73,9	+	+
10	52,5	41,5	54,8	+	+
11	61,0	50,0	82,7	+	+
12	54,0	43,0	62,4	+	+

DH – délka těla od začátku rostra až po konec hlavohrudi v milimetrech; **PODH** – délka hlavohrudi měřená od oční jamky po konec hlavohrudi v milimetrech; **V** – váha v gramech; **L** – levé klepeto; **P** – pravé klepeto; + – přítomné; - – nepřítomné; **ZR** – zlomené rostrum

4.4. Technika elektrostimulace

Metoda elektrostimulace u korýšů je mnohem méně rozpracována než u ostatních hospodářských nebo chovných zvířat. Elektrostimulace byla již ve světě zkoušena na krevetách, humrech a na australských racích yabby. U čeledí Cambaridae a Astacidae byla tato metoda vyzkoušena poprvé až při pokusech popsanych v této práci. Vzhledem k těmto okolnostem tak není rozpracována žádná metodika upřesňující postup elektrostimulace a přesné pohyby elektrod na bázi pátého páru pereopodů. Nejúčinnější technika elektrostimulace raků byla zjišťována během každého ze čtyř experimentů, neboť každý druh raka, ale i jedinec, mohl na různé provedení elektrostimulace reagovat odlišně.

4.5. Zpracování vzorků na T. E. M.

Zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii nebylo součástí mé práce, jednalo se spíše o výpomoc se zpracováním výsledků pro doktorskou práci, která na můj výzkum navazuje.

Vzorky odebraných spermatoforů, při kladné odezvě na elektrostimulaci, byly zpracovány v laboratoři (Příloha č. 6) přesně předepsaným postupem pro zpracování vzorků živočišného materiálu. Zpracování vzorků, kterých jsem se aktivně účastnil, se konalo celkem třikrát. Zpracování vzorků pokaždé probíhalo v průběhu tří dnů, vždy od pondělí do středy a trvalo celý den.

Den 1.

Nejprve před jakýmkoli zpracováním byly vzorky opatřeny čísly podle toho, o jaký vzorek se jednalo. Vzorky, které byly příliš velké, se rozřezaly pomocí dvou čepelí skalpelu na menší, se kterými se již mohlo pracovat. Vzorky se vložily pomocí pinzety zpět do plastových zkumavek. První fáze zpracování bylo vypírání v mycím roztoku, jedná se o 0,1 M pufr (destilovaná voda). Pomocí pipety se pufr umístil do zkumavek se vzorky, zkumavky se uzavřely a vložily do rotačního přístroje, který svým pohybem umožňoval dostatečné propírání vzorků. Po patnáctiminutovém vypírání se menší pipetou odsála veškerá tekutina ve zkumavce, aniž by se nasály i vzorky. Tento postup se ještě dvakrát opakoval. Po posledním vypírání pufr se do zkumavek napustil pufr společně se 4% roztokem OsO_4 (oxid osmičelý) v poměru 1:1 a opět se vzorky vložily do rotačního přístroje, kde se ponechaly po dobu 2 hodin. Za tuto dobu vzorky materiálu pod vlivem OsO_4 zčernaly (byly lépe viditelné). Vzorky se opět ošetřily 3 krát po sobě vypíracím roztokem. Po ukončení vypírací fáze procesu byl do zkumavek pipetou umístěn 30% aceton z důvodu odvodnění vzorků a vzorky se nechaly po dobu 15 min rotovat. Tento postup proběhl podobně i u 50% a 70% acetonu. Ve fázi odvodnění vzorků 70% acetonem bylo zpracování vzorků pro tento den ukončeno a vzorky byly vloženy do chladničky v laboratoři. Tab. 5.

Tab. 5 – Použité chemikálie a doba trvání.

Příprava vzorků 1. den	
Mycí roztok	3 × 15 min
Pufr + 4% roztok OsO ₄ 1:1	2 hod
Mycí roztok	3 × 15 min
30% aceton	15 min
50% aceton	15 min
70% aceton	15 min

Den 2.

Další den byly vzorky vyjmuty z chladničky a mohlo se pokračovat v acetonové řadě. Ze zkumavek byl odstraněn 70% aceton a zaměněn za 80% aceton. Vzorky se opět nechaly po dobu 15 min. rotovat a promíchávat. Postup se opakoval stejně u 90%, 95% a 100% acetonu. Po skončení acetonové řady byly buňky vzorků dokonale odvodněné. V průběhu působení 100% acetonu na vzorky byl připraven roztok pryskyřice a 100% acetonu v poměru 1:2, pryskyřice umístěná v mrazicím zařízení se nechala rozmraznout. Poté se společně se 100% acetonem v určeném poměru promíchala v kádince. Po skončení odvodňování se aceton ve zkumavkách zaměnil za předem připravený roztok pryskyřice, roztok se nechal působit po dobu jedné hodiny v rotačním zařízení. Mezitím byl připraven další roztok pryskyřice a 100% acetonu v poměru 1:1, který se po uplynulé hodině zaměnil za předešlý roztok. Tento postup zpracování vzorků byl proveden ještě jednou a to v poměru pryskyřice a acetonu, 2:1. Ze vzorků se pak odstranil roztok pryskyřice a acetonu. Do zkumavek se vzorky se v závěru dne dala pouze čistá pryskyřice a vzorky byly umístěny do chladničky. Tab. 6.

Tab. 6 – Použité chemikálie a doba trvání.

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

Den 3.

Poslední den zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii probíhal jen jednou fází, zalití vzorků do forem. Vzorky byly odebrány z chladničky, kam byly umístěny předešlý den a byla z nich pipetou odsáta pryskyřice. Pomocí pinzety se jednotlivé kousky vzorků vyndaly ze zkumavek a vložily se do pravé části gumových ohebných forem tzv. beamkapslí. Do těchto kapslí byly ke vzorkům vloženy papírky s čísly, shodnými s čísly na zkumavkách. Po tomto postupu byly jednotlivé kapsle naplněny pryskyřicí z injekční stříkačky. Pryskyřice musela vyplňovat jen určené kapsle se vzorky, v případě jejího rozlití mezi kapsle musela být pryskyřice opatrně odstraněna papírovými ubrousky. Po tomto procesu byly vzorky polymerizovány v termostatu po dobu 24 hodin.

V této fázi jsem ukončil zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii, polymerizované vzorky byly nadále zpracovány specializovanými odborníky laboratoře elektronové mikroskopie.

5. Výsledky

5.1. Technika elektrostimulace

Nejúčinnější technika pro získání spermatoforů se skládala ze dvou procedur, nejprve se obě elektrody přidržel na bázi pátého páru kráčivých nohou, po dobu cca 20 sekund, poté se jedna elektroda nechala na místě v okolí gonoporů. Druhou elektrodou se pravidelnými jemnými tahy samci „hladili“ na bázi pátého páru kráčivých nohou. Avšak i přesto, že se tento postup osvědčil, nemusí vést jeho uplatnění k pozitivním výsledkům, proto je důležité vždy vyzkoušet všechny možnosti.

5.2. Výsledky experimentů

Experiment č. 1 – rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

První experiment vytlačení spermatoforů pomocí elektrického stimulu byl úspěšný u 9 z 15 raků signálních (viz Tab. 7). Jedná se o 60 % jedinců, kdy samci při různém napětí vytlačili spermatofor alespoň z jednoho gonoporu. Zbýlých šest raků (40 %) nereagovalo na elektrostimulaci ani při zvýšeném napětí na 20 V žádnou odezvou bez rozdílu na velikosti, hmotnosti nebo počtu klepet. Z celkového počtu 15 raků došlo k vytlačení spermatoforů při napětí 10 V jen u 5 jedinců (33 %), z nichž u tří samců (20 %) došlo k vytlačení spermatoforů z obou gonoporů a u dvou (13 %) byly spermatofory vytlačeny jen z levého gonoporu. Poslední 4 samci raka signálního (27 %) reagovali při zvýšení napětí na 20 V vytlačěním spermatofor takto: dva raci z obou gonoporů (13,5 %) a dva (13,5 %) jen z pravého gonoporu. Chování raků po prodělání elektrostimulace nebylo sledováno, ale úmrtí následkem prodělaného experimentu nebylo zaznamenáno.

Tab. 7: Výsledky experimentu č. 1

Číslo raka	Vytlačení spermatoforu při 10 V		Vytlačení spermatoforu při 20 V	
	L	P	L	P
1	+	+	Nebylo provedeno	
2	+	+		
3	+	+		
4	+	-		
5	+	-		
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	+
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-

L – levý gonopor; **P** – pravý gonopor; + – pozitivní; - – negativní

Experiment č. 2 – rak pruhovaný (*Orconectes limosus*)

Experiment elektrostimulace ze dne 21. března 2011, provedený na 10 samcích raka pruhovaného, nebyl úspěšný. Z deseti jedinců podrobených elektrostimulaci o napětí 10 V nebylo dosaženo žádného pozitivního výsledku. Raci bohužel neprojevovali žádnou odezvu ani při následném zvýšení napětí na 20 V. Experiment na samcích raka pruhovaného byl tak ukončen s negativním výsledkem, i přesto, že se jednalo o typické období druhého páření raka pruhovaného. O důvodech negativního výsledku můžeme pouze spekulovat. Na racích nebyly žádné viditelné známky prodělané nemoci, infekce nebo poškození.

Experiment č. 3 – rak červený (*Procambarus clarkii*)

Při tomto experimentu ze dne 8. června 2011 se jednalo o elektrostimulaci 36 samců raka červeného dovezených ze Singapuru. U každého z 36 samců bylo nejprve opět použito napětí 10 V, při negativní odezvě na elektrický stimul bylo napětí zvýšeno na 15 V. I přes stejný postup, jako u předešlých experimentů, byl u všech 36 samců výsledek i při zvýšeném napětí stále negativní. Na racích nebyly pozorovány žádné viditelné známky nemoci nebo nějakého poškození.

Experiment č. 4 – rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

Experiment provedený dne 28. října 2011 na samcích raka signálního byl v období páření tohoto druhu. Ověřovala se tak účinnost elektrostimulace v období páření a mimo období páření raků signálních. Skupina dvanácti jedinců raků byla rozdělena na dvě poloviny, z nichž každá polovina skupiny raků byla vystavena jinému napětí (viz Tab. 8). První skupina šesti raků byla vystavena napětí 10 V při úspěšnosti 67 % (4 z 6), kdy byly spermatofovy vypuzeny z obou gonoporů samců. Zbylí dva samci (33 %) neprokázali žádnou odezvu při tomto napětí. U druhé skupiny bylo použito napětí pouze 15 V, jedná se o menší napětí, než bylo použito během experimentu na racích signálních v lednu 2011. Předpokládalo se, že když se jedná o období páření raků a působí samčí hormony, tak nebude třeba stejného napětí, než mimo období páření v lednu. Raci vystavení napětí 15 V vytlačili spermatofovy opět v 67 % případů (4 z 6), přičemž jen u dvou raků (33,5 %) došlo k odezvě od obou gonoporů a u dvou (33,5 %) došlo k vyprázdnění jen levých gonoporů. Úspěšnost elektrostimulace 12 samců raka signálního v období páření při různém napětí dosáhla 67 %. Raci podstoupili elektrostimulaci pouze jednou. Chování raků po prodělání elektrostimulace nebylo sledováno, ale úmrtí následkem prodělaného experimentu nebylo zaznamenáno.

Tab. 8: Výsledky experimentu č. 4

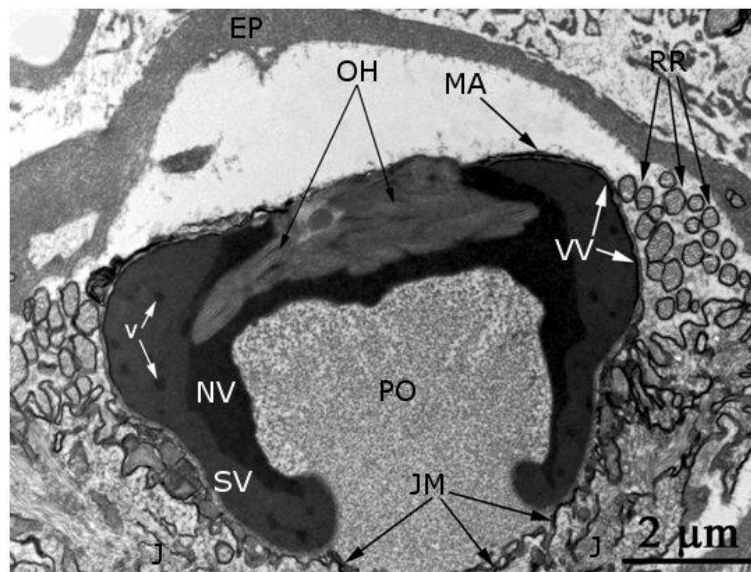
Číslo raka	Vytlačení spermatoforu při 10 V		Vytlačení spermatoforu při 15 V	
	L	P	L	P
1	+	+	Nebylo provedeno	
2	+	+		
3	+	+		
4	+	+		
5	-	-		
6	-	-		
7	Nebylo provedeno		+	+
8			+	+
9			+	-
10			+	-
11			-	-
12			-	-

L – levý gonopor; **P** – pravý gonopor; + – pozitivní; - – negativní

5.3. Výsledky T. E. M. a aktivity spermií

Tyto výsledky jsou v práci zpracovány jen informativně, neboť nejsou její přímou součástí. Avšak hrají důležitou roli v doktorské práci navazující na výzkum elektrostimulace u raků.

U odebraných vzorků z experimentů elektrostimulace zpracované v laboratoři elektromikroskopie nebylo zjištěno poničení nebo nevzhledný stav spermií následkem elektrického napětí (Obr. 8), který by znemožnil spermiím reprodukci.



EP – extracelulární pouzdro; OH – oblast hrotu spermie; MA – membrána akrozomu; RR – radiální ramena; VV – vnější vrstva akrozomu; J – jádro; JM – jaderná membrána; PO – podakrozomální oblast; SV – střední vrstva akrozomu; NV – nejvnitřnější vrstva akrozomu; V – vakuoly

Obr. 8 – Transmisní elektronová mikrofotografie spermie raka.

Vzorky spermií odebraných po kladné odezvě na elektrostimulaci a vyšetřených pod mikroskopem prokázaly, že spermie po vyloučení z těla samců nejsou aktivní. Je velká pravděpodobnost, že po procesu spáření, musí proběhnout ještě tzv. kapacitace spermií. To v podstatě vylučuje přímé použití takto získaných spermií k okamžitému oplodnění vajíček samice u raků.

6. Diskuze

Získávání spermatu u koryšů je v porovnání s rybami složitější. U většiny druhů ryb je výtěr spermatu prováděn manuálně masírováním břišních partií. U koryšů, zejména u krevet byla podobná metoda odzkoušena. Persyn (1977) popisuje metodu jako manuální stlačení samčích orgánů na základě pátého páru pereopodů. Bohužel manuální ejakulace většinou poškodila distální část chámovodu a tak krevety sterilizovala pro další použití (Chamberlain et al., 1983). Cílem však bylo získání spermatu od raků bez jakéhokoliv poškození nebo úmrtí. Na základě této zkušenosti bylo přistoupeno na metodu elektrostimulace, jejíž pozitivní výsledky byly již ověřeny na krevetách, humrech a australských racích. Samozřejmě v porovnání času stráveného s výtěrem spermatu u ryb se jedná o metodu zdlouhavou a mnohem složitější. Pro lepší získávání spermatu u ryb existuje také možnost injikace hormonálních přípravků pro dozrání spermií před výtěrem. U raků tato možnost není, avšak k lepším výsledkům získávání spermatu by mohlo pomoci zvýšení teploty vody a úprava fotoperiody (Jerry, 2001). U experimentů uvedených v této práci byla použita teplota vody závisící na ročním období, kdy byly experimenty provedeny.

Postup samotných experimentů vycházel z prací Kooda-Cisco a Talbot (1983), Sandifer et al. (1984) a Jerry (2001) a byl velmi podobný. Rozdílem v provedení bylo použité napětí při experimentech, které se pohybovalo v rozmezí od 10 do 20 V u různých experimentů, přičemž u humrů bylo použito 12 V napětí (Kooda-Cisco, 1983), u krevet rodu *Penaeus* (Sandifer et al., 1984) se použil střídavý proud o 4 – 6 V. Výzkum, ze kterého bylo ohledně metodiky nejvíce čerpáno, byl proveden na sladkovodních racích *C. destructor* (Jerry, 2001). Zde bylo pro vytlačení spermatoforů použito napětí v rozmezí od 11 do 16 V. U experimentů uvedených v této práci byla každá hodnota použitého napětí stejná u všech jedinců nezávisle na jejich velikosti nebo váze. Stejně jako napětí se lišila i použitá technika přiložení elektrod na bázi pátého páru pereopodů. Tato skutečnost různých technik získání spermatu je známa i u ryb, kdy u některých druhů ryb můžeme vytříst sperma pouze za pomoci hrubé síly. Někteří chovatelé dávají přednost jemnému hlazení (dráždění) břišních partií zejména v oblasti mezi břišními ploutvemi a řitním otvorem a až poté použití silnějšího masírování. Sandifer et al. (1984) popisuje pro elektrostimulaci krevet jako nehybné přiložení elektrod do oblasti gonoporů na jednu až dvě sekundy, po nichž došlo k vytlačení spermatofor. Jerry (2001) uvádí, že pokud po přiložení elektrod nedošlo do maximálně

10 sekund k vytlačení spermatoforů, byla elektrostimulace přerušena. V případě experimentů podrobených raků byla odzkoušena technika přidržení elektrod po dobu cca 10 až 15 sekund. Poté se jedna elektroda nechala na místě v okolí gonoporů a druhou elektrodou se pravidelnými jemnými tahy samci „hladili“ na bázi pátého páru kráčivých nohou. I přesto, že se tento postup osvědčil, nemusí vést jeho uplatnění k pozitivním výsledkům, proto je důležité vždy vyzkoušet všechny možnosti.

Elektrostimulace byla úspěšná pouze u experimentů č. 1 a č. 4, v obou případech se jednalo o raka signálního. Vytlačení spermatoforů samci nezáviselo na jejich délce nebo váze a ani zda samcům chyběla klepeta. Výsledky vytlačení spermatoforů z gonoporů samců prokázala funkčnost a účinnost elektrostimulace, i když procentuální úspěšnost byla o něco menší než u experimentů s elektrostimulací, které popisují Kooda-Cisco a Talbot (1983), Sandifer et al. (1984) a Jerry (2001). Výsledky těchto experimentů dokazují možnost získávání spermií během doby páření, ale i mimo dobu páření. Jerry (2001) uvádí možnost opakovaného sběru spermatoforů elektrostimulací.

Výsledek experimentů č. 2 a č. 3 byl bohužel negativní a o důvodech negativních výsledků můžeme pouze spekulovat. Experiment č. 2 na samcích raka pruhovaného probíhal v období druhého páření typického pro tento druh raka, na racích nebyly žádné viditelné známky prodělané nemoci, infekce nebo vážného poškození. Neúspěch tohoto experimentu by mohl být způsoben stresem raků z nového neznámého prostředí, neboť samci raka pruhovaného byli drženi v laboratoři krátkodobě. Dalším možným důvodem je předchozí páření raků na přírodní lokalitě, které mohlo vést k úplnému vyprázdnění chámovodů.

V průběhu druhého neúspěšného experimentu, a to experimentu č. 3 probíhající na druhu raka červeného, nebyly pozorovány žádné viditelné známky nemoci nebo nějakého vážného poškození. Důvod negativního výsledku elektrostimulace není přisuzován neefektnosti metody, ale spíše že období experimentu probíhalo zcela mimo období páření tohoto druhu. Za neúspěchem této metody u samců raka červeného by mohla být také nesprávná hodnota salinity, kterou potřebuje tento druh pro pohlavní dospívání. U těchto samců by měl být stres z neznámého prostředí vyloučen, protože samci byli, na rozdíl od samců raka pruhovaného použitých v experimentu č. 2, v laboratoři drženi nejméně jeden měsíc. Při měření délky a zjišťování počtu chybějících klepet bylo pozorováno, že někteří samci měli jedno nebo obě klepeta

výrazně menší. To by mohlo svědčit o nedávné ztrátě klepeta a jeho obnově, a tím by došlo k pozastavení pohlavního dospívání samců, jak popisuje O'Neill et al. (1993) u tohoto druhu raka. Je zapotřebí se také zmínit, že oba druhy raků zařazujeme do čeledi Cambaridae, což by mohl být jeden z faktorů neúspěchu experimentů č. 2 a č. 3. U této čeledi by se mohl objevit určitý druh imunity raků proti elektrostimulaci nebo by byla zapotřebí úprava podmínek experimentů. Experimenty však probíhaly za standardních podmínek a s možností imunity raků nebylo počítáno.

Metoda získávání spermatu u raků pomocí elektrostimulace se prokázala jako efektivní nejen díky úspěšnosti na samcích raka signálního, ale i prokázáním nepoškození spermií ve spermatoforech. Rozvinutí této metody může pomoci ve výzkumu umělého oplodňování vajíček raků. Bohužel jedním z problémů umělého oplodnění je kapacitace spermií, takže spermie získané pomocí elektrostimulace nemohou být použity přímo k oplodnění vajíček, jako je tomu při umělém výtěru ryb. Řešením by mohlo být ruční přenesení spermatoforů se spermiemi a jejich přichycení na samičí thelycum. Zde by již mohlo dojít k řádnému oplození vajíček a normálnímu vývoji embryí, jak vysvětlují Sandifer a Lynn (1980).

7. Závěr

Cílem mé práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se využití elektrostimulace pro získávání spermatu u koryšů a dále ověřit funkčnost této metody u raků. Experimenty jsem prováděl v průběhu roku 2011. Z výsledků mé práce lze vyčíst, že elektrostimulace je možný způsob získávání spermatu od raků. Jedná se o metodu, u které nedochází k poškození spermií a samců a je tedy možné opakovaně získávat od raků spermatofoxy se spermiemi. Sperma získávané touto metodou poslouží ke zkoumání spermatu raků a vývoje samčích gamet. V budoucnu by tak na základě této metody mohly např. vznikat račí spermabanky a pomoci při umělém oplodnění vajíček samic. Vzhledem k úspěchu elektrostimulace mohl na můj výzkum navázat Hamid Niksirat Hashjin, MSc., s jeho doktorskou prací *Biology of a gamete, gamete activation and fertilization in crayfish*, která je mimo jiné zaměřena na mikrostrukturu a životaschopnost spermií po elektrostimulaci. Na moji práci také navazuje postdoktorský grant Grantové agentury ČR: P502/12/P177 – *Basic biology of crayfish sperm with emphasis on the molecular and morphological modifications during capacitation and acrosome reaction* Ing. Antonína Kouby, PhD.

8. Literatura

- ABDU, U., G. YEHEKEL a A. SAGI, 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 37, 75–83.
- ANDO, H. a T. MAKIOKA, 1998. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zoological Science*, 15, 893–901.
- BEACH, D. a P. TALBOT, 1987. Ultrastructural comparison of sperm from the crayfishes *Cherax tenuimanus* and *Cherax albidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 7, 205–218.
- CABIDDU, S., M. C. FOLLESA, A. GASTONI, C. PORCU a A. CAU, 2008. Gonad Development of the Deep-Sea Lobster *Polycheltes typhlops* (Decapoda: Polichelidae) from the Central Western Mediterranean. *Journal of Crustacean Biology*, 28, č. 3, 494–501. ISSN 0278-0372. DOI: 10.1651/07-2908R.1. Dostupné z: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1651/07-2908R.1>
- CALADO, R., 2008. *Marine ornamental shrimp: biology, aquaculture and conservation*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 263 s. ISBN 14-051-7086-7.
- DUDENHAUSEN, E. E. a P. TALBOT, 1983. An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Canadian Journal of Zoology*, 61, 182–194.
- GELA, D., M. RODINA a O. LINHART, 2008. *Řízená reprodukce jeseterů (Acipenser)*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 24 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-62-4.
- HAMÁČKOVÁ, J., J. KOUŘIL, J. MASÁR a R. TURANSKÝ, 2007. *Technologie chovu keříčkovce jihoafrického - sumečka afrického (Clarias gariepinus)*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 19 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-63-0.
- HAMÁČKOVÁ, J., J. KOUŘIL a Z. ADÁMEK, 2008. *Řízená reprodukce a odchov plůdku jelce jesena (Leuciscus idus)*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 12 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-71-6.
- HAMR, P., 2002. *Orconectes*. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 585–608.
- HESSEN, D. O., T. TAUGBØL, E. FJELD a J. SKURDAL, 1987. Egg development and life-cycle timing in the noble crayfish (*Astacus astacus*). *Aquaculture*, 64, 77–82.
- HOLDICH, D. M. a I. D. REEVE, 1988. Functional morphology and anatomy. In: HOLDICH, D. M. a R. S. LOWERY (Eds), *Freshwater crayfish – Biology, Management and Exploitation*. Lodon: Croom Helm, Portland: Timber press, 11–51.
- HUNER, J. V. a J. W., Jr. Avault, 1976. The molt cycle of subadult red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Proceedings of the World Mariculture Society*, 7, 267–273.
- HUNER, J. V., 2002. *Procambarus*. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 541–584.
- HUXLEY, T. H., 1879. *The crayfish: an introduction to the study of zoology*. London. 371 s.

- CHAMBERLAIN, G. W., S. K. JOHNSON a D. H. LEWIS, 1983. Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. *Journal of the World Mariculture Society*, 14, 135–136.
- INGLE, R. W., 1977. Laboratory and SCUBA studies on the behaviour of the freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Report of the Underwater Association*, NS, 2, 1–15.
- JERRY, D. R., 2001. Electrical stimulation of spermatophore extrusion in the freshwater yabby (*Cherax destructor*). *Aquaculture*, 200, 317–322.
- JOHNSON, V. R., Jr., 1977. Individual recognition in the banded shrimp *Stenopus hispidus*. *Animal Behaviour*, 25, 418–428.
- KLIMENT, J., M. NOVÁK, O. ROB, J. HINTNAUS a P. ŠŤASTNÝ, 1989. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. 2. přeprac. vyd. Bratislava: Príroda, 392 s. Živočišna výroba. ISBN 80-07-00027-5.
- KOLÁŘOVÁ, J., J. VELÍŠEK, L. NEPEJCHALOVÁ, Z. SVOBODOVÁ, J. KOUŘIL, J. HAMÁČKOVÁ, J. MÁCHOVÁ, V. PIAČKOVÁ, J. HAJŠLOVÁ, K. HOLADOVÁ, V. KOCOUREK, E. KLIMÁNKOVÁ, H. MODRÁ, R. DOBŠÍKOVÁ, L. GROCH a L. NOVOTNÝ, 2007. *Anestetika pro ryby*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 19 s. Metodika. ISBN 80-85887-61-4.
- KOODA-CISCO, M. J. a P. Talbot, P., 1983. A technique for electrically stimulating extrusion of spermatophores from the lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture*, 30, 221–227.
- KOUŘIL, J. a F. KUBŮ, 1985. *Lin obecný*. Praha: Český rybářský svaz, 100 s.
- KOUŘIL, J., O. LINHART a J. HAMÁČKOVÁ, 1992. *Umělý výtěr sumce velkého*. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 9 s. Metodika. ISBN 80-901087-7-6.
- KOUŘIL, J., J. HAMÁČKOVÁ, A. LEPIČOVÁ, Z. ADÁMEK, P. LEPIČ, P. KOZÁK a T. POLICAR, 2008. *Řízená reprodukce odchov plůdku perlína ostrobřichého a hrouzka obecného*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 12 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-06-8.
- KOZÁK, P., M. BUŘIČ, A. KOUBA, T. POLICAR, 2008. *Metodika chovu raka říčního*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 36 s. Metodika. ISBN 978-80-85887-03-7.
- KOZÁK, P., T. POLICAR, M. Buřič, A. Kouba, 2009. *Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR*. 2. přeprac. vyd. Metodika, Vodňany: fakulta rybářství a ochrany vod, 92, 27 s.
- KRÁL, J. a Z. SVOBODOVÁ, 1990. *Menocain - čs. anestetikum pro ryby*. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 7 s. Metodika. ISBN 80-9000541-1.
- KROL, R. M., W. E. HAWKINS a R. M. OVERSTREET, 1992. Reproductive components. In: HARRISON, F. W. a A. G. HUMES (Eds). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York: Wiley-Liss, 10, 295–343.
- KRUPAUER, V. a F. KUBŮ, 1985. *Kapr obecný*. Praha: Český rybářský svaz, 201 s.
- LAWRENCE, C. S. a N. M. MORRISSY, 2000. *Yabby farming – frequently asked questions*. Fisheries WA, Perth.

- LAWRENCE, C. a C. JONES, 2002. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 635–669.
- LEWIS, S. D., 2002. *Pacifastacus*. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 511–540.
- LÓPEZ-CAMPS, J., R. BARGOLLO, M. G. BOZZO, M. DURFORT, R. FONTARNAU, 1981. The spermatogenesis of crustaceans: VII. Review of spermatozoon of the Crayfish *Astacus astacus*. *Gamete Research*, 4, 65–82.
- LUSK, S. a J. KRČÁL, 1982. *Štika obecná*. Rakovník: Český rybářský svaz, 84 s.
- LUSK, S., L. SKÁCEL a B. SLÁMA, 1987. *Lipan podhorní*. Praha: Český rybářský svaz, 155 s.
- MENTE, E., I. T. KARAPANAGIOTIDIS, P. LOGOTHETIS, D. VAFIDIS, E. MALANDRAKIS, N. NEOFITOU, A. EXADACTYLOS a A. STRATAKOS, 2009. The reproductive cycle of Norway lobster. *Journal of Zoology*, 278, č. 4, 324–332. ISSN 09528369. DOI: 10.1111/j.1469-7998.2009.00579.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7998.2009.00579.x>
- MOSES, M. J., 1961. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*): II. Description of stages. *Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology*, 10, 301–333.
- O'NEIL, D. J., D. P. FRENCH, S. REBACH a T. D. HANWERKER, 1993. Chelae removal alters attainment of sexual maturity in male *Procambarus clarkii* (Girard) and mortality in groups. *Freshwater Crayfish*, 9, 38–49.
- PERSYN, H. O., 1977. Artificial insemination of shrimp. United States Patent 4 031 855.
- POLJAROEN, J., R. VANICHVIRIYAKIT, Y. TINIKUL, I. PHOUNGPETCHARA, V. LINTHONG, W. WEERACHATYANUKUL, P. SOBHON, 2010. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Zoologischer Anzeiger*, 249, 81–94.
- PONGTIPPATEE, P., R. VANICHVIRIYAKI, J. CHAVADEJ, P. PLODPAI, B. PRATOOMCHART, P. SOBHON a B. WITHYACHUMNARNKUL, 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 38, 1635–1644.
- PÖCKL, M., 1999. Distribution of crayfish species in Austria with special reference to introduced species. *Freshwater Crayfish*, 12, 733–750.
- RUDOLPH, E. H., 1995a. Partial protandric hermaphroditism in the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 15, 720–732.
- RUDOLPH, E. H., 1995b. A case of gynandromorphism in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana*, 68, 705–711.
- SANDIFER, P. a J. LYNN, 1980. Artificial insemination of Caridean shrimp. In: W. H. CLARK a T. S. ADAMS. *Advances in Invertebrate Reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 271–288.
- SANDIFER, P. A., A. L. LAWRENCE, S. G. HARRIS, G. W. CHAMBERLAIN, A. D. STOKES a W. A. BRAY, 1984. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* Spp. *Aquaculture*, 41, 181–187.

- SKURDAL, J. a T. TAUGBØL, 2002. *Astacus*. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 467–510.
- TALBOT, P. a R. G. SUMMERS, 1978. The structure of sperm from *Panulirus*, the spiny lobster, with special regard to the acrosome. *Journal of Ultrastructure Research*, 64, 341–351.
- TAUGBØL, T., S. B. WRVÅGEN, A. N. LINLØKKEN a J. SKURDAL, 1987. Post-molt exoskeleton mineralisation in adult noble crayfish, *Astacus astacus*, in three lakes with different calcium levels. *Freshwater Crayfish*, 11, 219–226.
- VOGT, G., 2002. Functional Anatomy. In: HOLDICH, D. M. (Ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 53–151.
- WOODLOCK, B. a J. D. REYNOLDS, 1988. Laboratory breeding studies of freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Freshwater Biology*, 19, 71–78.
- ZHANG, D., J. LIN a R. L. CRESWELL, 1998. Mating behavior and spawning of the banded coral shrimp *Stenopus hispidus* in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 511–518.

9. Seznam příloh

Příloha č. 1 – Samec raka signálního.

Příloha č. 2 – Samec raka červeného.

Příloha č. 3 – Samec raka pruhovaného.

Příloha č. 4 – Samci raka pruhovaného před měřením a vážením.

Příloha č. 5 – Stimulace ejakulace u raka pruhovaného pomocí elektrod.

Příloha č. 6 – Laboratoř elektronové mikroskopie.

Příloha č. 7 – Elektronový mikroskop.

10. Přílohy



Příloha č. 1 – Samec raka signálního (Kozák et al., 2009).



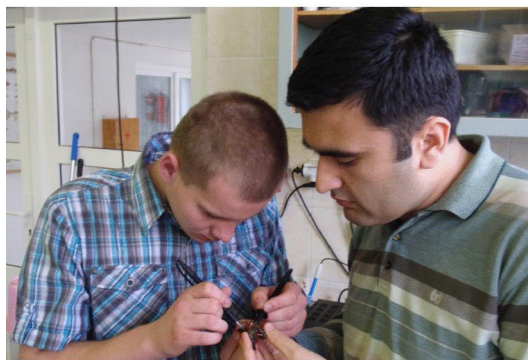
Příloha č. 2 – Samec raka červeného (Kozák et al., 2009).



Příloha č. 3 – Samec raka pruhovaného (Kozák et al., 2009).



Příloha č. 4 – Samci raka pruhovaného před měřením a vážením.



Příloha č. 5 – Stimulace ejakulace u raka pruhovaného pomocí elektrod.



Příloha č. 6 – Laboratoř elektronové mikroskopie.



Příloha č. 7 – Elektronový mikroskop.

11. Abstrakt

Raci patří k důležitým a nepostradatelným živočichům v akvakultuře. Ve vodním prostředí vystupují jako predátoři, slouží jako potrava pro jiné ryby, působí jako detrivoři a jsou důležitým prvkem v koloběhu živin a energie ve vodním ekosystému. V dnešní době jsou však původní evropské druhy raků na ústupu z důvodu nevhodných úprav toků, znečištěním vod a výskytu račího moru. Hlavní cíl mé práce bylo zkoumání vlivu elektrostimulace na samce raků a získávání pohlavních produktů – spermií. Principem tohoto zkoumání bylo zjišťování, zda samec vlivem elektrického stimulu v oblasti gonoporů je schopen vytlačit spermatofoxy se spermiemi. Při experimentech byl použit transformátor na střídavý proud. Všechny experimenty probíhaly v laboratoři experimentálního rybochovného zařízení ve Vodňanech. Experimenty proběhly v průběhu roku 2011 na samcích raka pruhovaného (*Orconectes limosus*), raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) a raka červeného (*Procambarus clarkii*). Výsledky této práce a úspěšnost experimentů naznačují, že je možné získat pohlavní produkty (spermie) pomocí elektrostimulace. Výsledky laboratoře elektronové mikroskopie potvrzují neškodnost elektrostimulace na tvar a stavbu spermií. V budoucnu je tedy možné použít spermie k umělému oplodňování račích vajíček. Problém je však s kapacitací spermií.

Klíčová slova: raci, elektrostimulace, spermatofor, spermie, transformátor, střídavý proud.

12. Abstract

The crayfish are important and indispensable animals in aquaculture. In the aquatic environment, they have a role as predators, food for other fish, detritivores and they are an important element in the circulation of the energy and the nutrient in the aquatic ecosystem. Today, number of the European crayfish species populations is decreasing. It is caused by unfavourable regulation of streams, water pollution and the occurrence of crayfish plague. The main purpose of present study was examining the impact of electrostimulation on the males of the crayfish and obtaining sex products (the sperm). The principle of this research was determining whether the male of crayfish are able to extrude spermatophore with sperm by an electric stimulus. The transformer was used as resource alternating current in experiments. All experiments conducted in a laboratory of experimental device for fish farming in Vodňany. Experiments were conducted in 2011 on a male of the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*), the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). The results of this work and success of the experiments suggest, that electrostimulation could be used for obtaining sex products (the sperm) from crayfish males. Results from a laboratory of electron microscopy confirm the harmlessness of electrostimulation on the shape and structure of sperm. The sperm can be used to artificial insemination of the crayfish eggs in future. However, sperm capacitation is problematic.

Key words: crayfish, electrostimulation, spermatophore, sperm, transformer, alternating current.