

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA RYBÁŘSTVÍ A MYSLIVOSTI

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ CHARAKTERISTIKA
SPERMATU OKOUNA ŘÍČNÍHO (*PERCA FLUVIATILIS*) JAKO
PERSPEKTIVNÍHO DRUHU PRO SLADKOVODNÍ
AKVAKULTURU

autor bakalářské práce

JAN KAŠPAR

vedoucí diplomové práce

ING. MARTIN FLAJŠHANS, DR.RER.AGR.

odborný konzultant

Ing. Marek Rodina, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 2008

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, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

18.4.2008

Jan Kašpar

Je mi ctí na tomto místě poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Martinovi Flajšhansovi, Dr.rer.agr. za odborné vedení a především za cenné rady a připomínky při práci s moderní mikroskopovou technikou a v průběhu utváření bakalářské práce. Můj dík patří také Ing. Radkovi Vachovi a Ing. Martinovi Musilovi DiS. za obětavou práci a pomoc při terénních odběrech a zpracovávání vzorků spermatu. Za pomoc při práci se vzorky v laboratoři oddělení genetiky bych také rád poděkoval Ing. Markovi Rodinovi PhD., paní Marii Pečené a paní Ivě Samkové.

Děkuji

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	1
3. Literární přehled	2
3.1 Základní biologické a výtěrové charakteristiky okouna říčního (<i>Perca fluviatilis</i>)..	2
3.1.1 Systematické zařazení.....	2
3.1.2 Rozšíření a výskyt.....	3
3.1.3 Popis.....	3
3.1.4 Zbarvení.....	4
3.1.5 Pohlavní dimorfismus.....	5
3.1.6 Karyotyp.....	5
3.1.7 Smyslové orgány.....	5
3.1.8 Trávicí a rozmnožovací soustava.....	6
3.1.9 Stanoviště a chování.....	7
3.1.10 Nároky na prostředí.....	9
3.1.11 Věk a růst.....	9
3.1.12 Potrava.....	10
3.1.13 Reprodukce.....	11
3.1.13.1 Přirozené rozmnožování.....	11
3.1.13.2 Řízená reprodukce okouna.....	11
3.2 Sperma.....	13
3.2.1 Semenná plasma.	13
3.2.2 Obecná charakteristika spermií ryb s vnějším oplozením.....	14
3.2.3 Koncentrace spermií.....	14
3.2.4 Pohyblivost spermií.....	15
3.3 Charakteristika spermií okouna říčního (<i>Perca fluviatilis L.</i>).....	15
4. Materiál a metodika	16
4.1 Fixace vzorku pro počítání koncentrace spermií.....	16

4.2 Měření osmoality.....	17
4.3 Měření spermatokritu.....	17
4.4 Určení věku ryb.....	17
4.5 Fluorescenční stanovení ž/m spermií pomocí metody dvojího barvení.....	17
4.5.1 Postup stanovení ž/m spermií.....	17
4.5.2 Vyhodnocování poměru ž/m spermií.....	19
5. Vlastní výsledky a vyhodnocení.....	20
5.1 Koncentrace spermií.....	22
5.2 Osmoalita.....	24
5.3 Fluorescenční stanovení živých/mrtvých spermií.....	24
6. Diskuze.....	28
7. Souhrn (Závěr).....	30
7. Seznam literatury.....	31

1. ÚVOD

V posledních letech se soustřeďuje zájem evropských chovatelů sladkovodních ryb okolo okouna říčního. Je to jednak proto, že se okoun stal velmi žádanou rybou na stolech konzumentů. Druhým důvodem je jeho vysoká kvalita masa a schopnost vysokého přírůstku v podmínkách s dobrou potravní nabídkou. Jestliže máme rybu s takovými vlastnostmi, vyvstává zde přirozeně požadavek na jeho umělý chov, což předpokládá plné zvládnutí odchovného cyklu v zajetí. Jedním z předpokladů je zvládnutí umělé reprodukce, což předpokládá co možno nejkvalitnější reprodukční vlastnosti tj. možnost kryogenického uchování spermatu, vysoké procento živých spermií, vysoká produkce mlíčí a možnost pozitivní selekce z generačního či remontního hejna.

Jsme ovšem teprve na začátku cesty, poněvadž okoun je u nás dosud hospodářsky víceméně opomíjenou rybou. V některých zemích západní Evropy (Belgie, Francie, Irsko) je v poslední době věnována pozornost reprodukci a biologii, odchovu a tržní produkci okouna říčního včetně metod produkce monosexních populací. Česká republika se k těmto zemím připojila v letech 2004 – 2006 formou společného podnikatelského výzkumného projektu COOP-CT-2004-512629, kterého se účastnil VÚRH JU ve Vodňanech a některé podnikatelské subjekty v rybářství. Většinou však chov okouna říčního v rybnících je záležitostí na úrovni doplňkového druhu. Nikde se neregistrují generační hejna, ale ponechává se vše v rukou přírody. Sehnat proto kvalitní materiál je dlouhodobou záležitostí s mnoha komplikacemi, jako je třeba nízká odolnost vůči mechanické manipulaci při odběru vzorků. Nicméně to není otázkou této práce.

Zbývá doufat, že se naše společné bádání na poli neoraném dobere pozitivních výsledků a budeme mít možnost obohatit lidský jídelníček o tuto mimořádně chutnou rybu, již si v současné době u nás dopřává jen něco málo sportovních a profesionálních rybářů.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce je stanovení kvalitativní a kvantitativní charakteristiky spermatu okouna říčního (*Perca fluviatilis L.*), jakožto nového druhu pro sladkovodní akvakulturu, se zvláštním zřetelem na stanovení živých a mrtvých spermií dvojím fluorescenčním barvením. Možnosti kryogenického uchování spermatu jsou důležité pro budoucí propracování účelné řízené reprodukce.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 ZÁKLADNÍ BIOLOGICKÉ A VÝTĚROVÉ CHARAKTERISTIKY OKOUNA

ŘÍČNÍHO (*PERCA FLUVIATILIS*)

3.1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ

Taxonomické zařazení okouna říčního:

- Kmen : Strunatci (*Chordata*)
- Podkmen : Obratlovci (*Vertebrata*)
- Třída : Ryby (*Osteichties*)
- Nadřád : Kostnatí (*Teleostei*)
- Řád : Ostnoploutví (*Perciformes*)

Tento řád je vývojově nediverzifikovanějším řádem ryb a největším řádem obratlovců. Dominují v mnoha vodách teplého pásma a dominantními obratlovci v oceáně (Baruš, Oliva et al., 1995). Zahrnuje ryby se dvěma hřbetními ploutvemi a plynovým měchýřem jenž nemá spojení s jícnem (Egert et al., 1984). Baruš et al. (1995) odkazují na Nelsona (1976), který uvádí 18 podřádů s cca 6880 druhy, nebo na Berga (1945, 1955) a jeho 8000 druhů. V našich vodách se vyskytují zástupci 3 podřádů – Percoidi, Gobioidi a Cotoidei (Baruš, Oliva et al., 1995).

- Podřád : Okounovití (*Percoidi*)

Jedná se o největší podřád řádu Perciformes, zahrnuje 72 čeledí, cca 600 rodů a na 4000 mořských i sladkovodních druhů, vyskytujících se hlavně v oblastech tropického a subtropického pásma. Směrem k pólům jich výrazně ubývá a jen některé sladkovodní druhy lze nalézt severněji od polárního kruhu. V České Republice se v současné době vyskytují jen tři zástupci čeledi Percidae a introdukované čeledi Centrarchidae (Baruš et al., 1995)

- Čeleď : Okounovití (*Percidae*)
- Podčeleď : Okouni (*Percinae*)
- Rod : Okoun (*Perca*)

Zahrnuje dva, podle některých autorů tři, druhy žijící v Evropě, Asii a Severní Americe. Švátora (1986) zmiňuje kromě okouna říčního (*Perca fluviatilis*) druh *Perca*

schrenki Kessler, 1974, vyskytující se v jezerech Alakul a Balchaš v bývalém SSSR. Ve východní části Severní Ameriky žije poddruh *Perca fluviatilis flavescens* (Mitchill), původně rozšířen od Labradoru po Georgii a východně po Mississippi. Později však expandoval i jižněji a západněji. O jeho systematickém zařazení se stále diskutuje. Někteří autoři ho považují za poddruh, jiní uvádějí okouna říčního a *P. f. flavescens* jako dva samostatné druhy (Baruš et al., 1995).

3.1.2 ROZŠÍŘENÍ A VÝSKYT

Švátora (1986) tvrdí, že okoun je díky třetihorním fosilním nálezům znám z Kazachstánu, oblasti středního Irťiše, pohoří Altaj, Rakouska a Německa. Ze čtvrtohorních pak z východní části dnešního areálu, východněji od řeky Kolymy, což by dávalo za pravdu názorům, že se tento druh dostal do Severní Ameriky přes pevninský most Beringovy úžiny. Dnes je okoun říční rozšířen v celé Evropě s výjimkou Skotska, jižních Evropských poloostrovů a Norska. Vyskytuje se v celé severní části Asie, patřící k úmoří Severního ledového oceánu (Lusk et al., 1983). Jak uvádí Švátora (1986), jeho výskyt byl potvrzen také v severním Turecku, v úmoří Bílého moře a pobřežních oblastech Baltského moře, kde se salinita pohybuje v rozmezí 7 – 10 promile. Dále pak v Turkménii v jezeře Jaschan, v Aralském jezeře, v řekách Amu – Darja a Syr – Darja. Neuvádí jeho výskyt v Kaspickém moři, Balchašském jezeře, v řekách ústících do Tichého oceánu, v Anadrynu, na Kamčatce, Sachalinu, v Amuru a řekách jižně od něj. Introdikován byl na Tasmánii, Novém Zélandu, v Austrálii a oblasti jižní Afriky. V roce 1971 byl spolu s ploticí vysazen také na Kypr (Plička, 1981).

U nás se vyskytuje ve všech vhodných biotopech (Baruš et al., 1995). Nejlépe mu vyhovují mírně tekoucí vody s dostatkem úkrytů (Egert et al., 1984), kde vytváří pravidelně stejnověká hejna (Hartman et al., 1998). Okoun je ryba větších hlubokých vod, daří se mu v úživných údolních nádržích. V malých a studených říčkách zakrňuje, zatímco v parmových a cejnových pásmech lze lovit i okouny o hmotnosti nad 1 kg (Šimek 1954).

3.1.3 POPIS TĚLA

Tělo okouna je vysoké, ze stran mírně zploštělé, za hlavou se klenoucí v příznačný „hrb“ (Šimek, 1954). Výška těla je největší v oblasti nad základnou břišních ploutví. Ústa jsou koncová, jemné ozubená. Zuby drobné, hřebínkovité. Zadní okraj horní čelisti se může pohybovat směrem dolů i vysouvat se dopředu. Okraj dolní čelisti je masitý a napomáhá pevnému uzavření ústního otvoru. Zuby vyrůstají i na patrových kostech, na kosti radličné a

na vnějších křídlatých kostech. Drobná planktonní potrava je v ústní dutině zachycována pomocí žaberního aparátu. První čtyři žaberní oblouky nesou na zadní straně žaberní lupínky, zásobené krví, které umožňují výměnu plynů mezi vodou a krví (Švátora, 1986). Oči okouna jsou velké, výrazné a na všechny strany pohyblivé. Skřetové kosti jsou na okrajích pilovitě zoubkované a končí protáhlým trnem. Pro okouna je příznačná dvojice mohutných hřbetních ploutví. Odděleně za sebou stojících. Charakteristickým znakem je také uspořádání prsních a břišních ploutví; břišní jsou posunuty až k prsním a tvoří s nimi jakýsi pevný vaz. I řitní ploutev je posunut značně dopředu, takže okounova břišní dutina je v porovnání s dutinou ostatních ryb kratší (Šimek, 1954). Ploutve jsou orientovány vertikálně, což pomáhá udržovat tělo ve vertikální pozici (Švátora, 1986). Ploutevní vzorec okouna je: D₁XIII – XVII; D₂I – III, 13 – 16; A II, 8 -9; V I, 15; P 14 (Lusk et al., 1983).

Šupiny okouna jsou ktenoidní. Tento typ šupin má zadní okraj pokrytý jemnými hřebenitými zoubky vytvořených sklovitou vrstvou. Ve svém vývoji procházejí nejdříve stadiem šupin cykloidních a teprve později se začnou vytvářet zoubky, což způsobuje, že je tělo okouna na omak drsné (Egert et al., 1984). Přední část šupiny, která je vrostlá v kůži, je rozdělena do 6 – 8 výběžků. Na rozdíl od šupin cykloidních, neprobíhají u ktenoidních šupin jednotlivé přírůstkové zóny – sklerity po obvodu celé šupiny, ale jsou v její zadní, hřebenité části přerušeny (Švátora, 1986). Šupiny postranní čáry, kterých je 54 – 68, nepřecházejí na ocasní ploutev. Počet řad nad postranní čarou je 7 – 10, pod postranní čarou 12 – 18. Žaberních tyčinek má okoun 21 – 24 (počítáno na vnější straně levého žaberního oblouku) (Švátora, 1986). Na skřelích okouna se vyskytují i šupiny cykloidní (Egert et al., 1984). Počet šupin v postranní čáře a počet žaberních tyčinek se podle Řepy (1995, in Baruš et al., 1995) zvyšuje s rostoucí délkou těla, ale až do 100mm se hodnota těchto znaků nemění.

3.1.4. ZBARVENÍ

Základní zbarvení okouna je žlutozelené a šedé, hřbet je zelenočerný. Boky těla jsou žlutavé až žlutohnědé s mosazným leskem, břicho bývá bělavé nebo žlutavé. Na bocích těla má okoun 5 – 9 hnědých, nebo hnědočerných příčných pruhů, které nesahají hluboko na boky. Pruhy nebývají vždy zřetelné, Někdy mohou být i jen slabě naznačené, nebo i zcela chybí. Vzácně byly pozorováni jedinci žlutě, nebo citrónově žlutě zbarvení (Švátora, 1986). Přední hřbetní ploutev je šedá až hnědošedá, s výraznou černou skvrnou mezi posledními 2 – 3 ostny, která nikdy nechybí, i když pruhování může vymizet. Druhá hřbetní ploutev je žlutohnědá nebo žlutozelená, průhledná. Prsní ploutve jsou nažloutlé, břišní a řitní červené, ocasní ploutev je zejména při okraji spodního laloku červená, její horní polovina je šedočerná, někdy

s červeným nádechem (Baruš et al., 1995). Přítomnost černé skvrny na první hřbetní ploutvi uvádí jako významný znak všichni autoři, i když podle Šimka (1954) je nejvýraznější u mladých ryb, kdežto u ryb starších se někdy téměř ztrácí. Nejjasnější barvy mají podle výše uvedeného autora ryby z bohatě zarostlých, hlubokých, starých tůní. Barva oční duhovky je oranžová (Baruš et al., 1995; Pospíšil, 2000; Švátora, 1986).

3.1.5 POHLAVNÍ DIMORFISMUS

Pohlavní dimorfismus není u okouna výrazněji vyvinut. Podle měření párových ploutví se zjistilo, že u samic jsou delší. Rozdíl je však nepatrný (Vladikov, 1931; Oliva, 1953). Samice lze odlišit krátce před třením podle zvětšené břišní dutiny a po tření podle rozšířené močopohlavní papily. Tento rozlišovací znak však 2. – 3. týden po tření již není patrný (Švátora, 1986).

3.1.6 KARYOTYP

Diploidní počet chromozómů je $2n = 48$. Karyotyp je složen ze 2 metacentrických, 24 submetacentrických, 12 subtelocentrických a 10 akrocentrických chromosomů (Klinkhardt et al., 1991). Jeden pár větších sm chromozómů nese na kratším raménku achromatickou oblast, kde je lokalizován organizátor jadérka. Vyšetřování jedinci z Labe a Dunaje měli shodný karyotyp (Baruš et al., 1995).

3.1.7 SMYSLOVÉ ORGÁNY

Na hlavě okouna jsou nápadné velké oči umístěné po stranách hlavy. Zrak je důležitým smyslem, protože okoun je rybou s denní až soumráchnou aktivitou a při pohybu a lovu potravy se orientuje převážně zrakem. Velké oči mají denní dravci a druhy lovcí za šera. Stavba oka je podobná jako u jiných druhů ryb (Švátora, 1986). Rybí oko je krátkozraké, takže normálně vidí ryby asi na vzdálenost 5m (Egert et al., 1984).

Poněkud před očima směrem dopředu a nahoru leží párové nozdry, uvnitř kterých je orgán čichu. Otvírají se každá dvěma otvory. U okouna jsou oba otvory okrouhlé, zadní okraj předního otvoru je vyvýšen a má tvar podobný mušli. Čichová sliznice je v čichové jamce, která má u okouna vakovitě rozšířené stěny. Její dno je zvrásněné záhyby vybíhajícími z jeho středu do stran. Na záhybech jsou rozmístěny čichové buňky. Při pohybu voda vchází do předního otvoru, dostává se do čichové jamky a vychází přes zadní otvor ven. Tím je zajištěna stálá výměna vody v čichovém orgánu (Švátora, 1986). Podle Egerta et al. (1984) má okoun poměrně dokonalý čich díky zmíněnému vakovitému rozšíření stěn čichových jamek a jejich

vychlípeninám, jež mu umožňují při smrštění vodu vypudit a naopak při rychlém rozšíření nasát.

Chuťové ústrojí je tvořeno chuťovými buňkami, které se u okouna nacházejí v ústní dutině a v menší míře i na povrchu těla. Hmatové ústrojí tvoří buňky uložené v kůži v podobě hmatových pupenů. Jsou soustředěny především na povrchu hlavy a v ústní dutině (Švátora, 1986).

Významným smyslovým orgánem je ústrojí postranní čáry. Tento orgán informuje rybu o přítomnosti kořisti, nepřítele, jiné ryby, ale i o rybáři krácejícím po břehu a o překážce v plavbě. Slouží rybám k přenášení vjemů o změnách v tlaku a proudění vody. Mechanické vibrace, vznikající pohybem ve vodě, jsou registrovány smyslovými buňkami postranní čáry. Systém orgánu postranní čáry je rozvětven jednak na hlavě, jednak se táhne středem těla. U okouna nejsou kanály tohoto systému umístěné na hlavě tak dobře patrné, jako například u štiky. U okouna je v systému postranní čáry vytvořen jediný kanálek, který leží pod řadou šupin postranní čáry, jež mají otvory, kterými vlnění vody prostupujeme ke smyslovým buňkám (Švátora, 1986). Postranní čára okouna sleduje podle Šimka (1954) křivku hřbetu a je tedy značně vzhůru vyklenutá, i když celkem málo zratelná.

Sluchové ústrojí ryb, nebo také staticko-akustické ústrojí, je jednak orgánem sluchovým a jednak orgánem rovnováhy a odpovídá vnitřnímu uchu vyšších obratlovců. Je uloženo v zadní části lebky v kostěné schránce. Tvoří jej tzv. bludiště a tři polokruhové chodby. Bludiště se skládá ze dvou váčků - vejčitého (*utrículus*) a kulatého (*sacculus*) ze kterého vybíhá krátký výběžek (*lagena*). Uvnitř bludiště se nacházejí tři sluchové kaménky z CaCO_3 - otolity nebo také statolity (Švátora, 1986).

Podněty z vnějšího prostředí registrované smyslovými orgány jsou převáděny do ústřední nervové soustavy. Základní stavba nervové soustavy okouna je stejná jako u ostatních kostnatých ryb.

3.1.8 TRÁVICÍ A ROZMNOŽOVACÍ SOUSTAVA

Trávicí soustava sestává z úst, hltanu, jícnu, žaludku a střeva. Potrava zachycená v ústní dutině postupuje přes hltan do jícnu a odtud do žaludku, který je dobře vyvinut (Švátora, 1986). Okoun má svalnatý roztažitelný žaludek se širokou částí sestupnou a užší vzestupnou. Sestupná část žaludku přechází ve slepý žaludeční vak. Ze vzestupné části žaludku vybíhají 3 silné pylorické výběžky (Egert et al., 1984), zvětšující trávicí plochu střeva, které je poměrně krátké a dosahuje 70 – 100% délky těla. V dutině břišní vytváří několik kliček a končí řitním otvorem, který leží před řitní ploutví před vývodem močového

měchýře a pohlavních žláz (Švátora, 1986).

Na trávení potravy se kromě žaludku, kde působí v kyselém prostředí enzym pepsin, podílí i játra a slinivka břišní svými trávicími fermenty. Baruš et al. (1995) uvádí hodnoty žaludečních šťáv u okouna během trávení okolo pH 2 a vyšší aktivitu pepsinu u dravých ryb než u suchozemských organismů. Játra jsou u okouna jednodločná, umístěná v levé přední části břišní dutiny (Švátora, 1986). V játrech se také ukládají zásobní látky pro zimní období, zejména glykogen a tuky. Příliš silné ukládání tuku při nesprávné jednostranné výživě nebo při nesprávném krmení ryb může vést k tukové degeneraci jater (Egert et al., 1984). Na zadní straně jater je hruškovitý žlučník červenavého nebo jantarovohnědého zbarvení. Žlučovod vyúsťuje poblíž předního pylorického výběžku. Slinivka břišní je rozptýlena podél stěv střeva. Poblíž střeva můžeme vidět také slezinu tmavočervené barvy. Protáhlý tenkostěnný plynový měchýř vyplňuje celou horní část břišní dutiny. U okouna nemá přímé spojení s jícnem, jako například u kapra. Toto spojení existuje pouze v embryonální fázi vývoje, později se přerušuje. Na spodní straně plynového měchýře leží tzv. plynové žlázy, které vylučují do plynového měchýře směs plynů z krve. K regulaci množství plynu v měchýři slouží část měchýře v jeho zadní části na hřbetní straně, prostřednictvím které se plyn opět vstřebává do krve (Švátora, 1986). Složení plynů v plynovém měchýři bývá dle Baruše et al. (1995) udáváno v procentech: 14,6 – 16,5 O₂, 82,5 – 83,2 N₂, 1,5 – 2,9 CO₂. Na hřbetní straně břišní dutiny leží párové protáhlé ledviny, ze kterých vyúsťují močovody, které se spojují v jeden nepárový společný močovod. Ten na konci vytváří tenkostěnný močový měchýř, vyúsťující na povrch těla těsně před řitní ploutví. Samčí gonády – varlata jsou párové žlázy protáhlého tvaru, bílé až žlutobílé barvy, probíhající po celé délce břišní dutiny (Švátora, 1986). Baruš, Oliva et al. (1995) uvádí, že varlata okouna na zadním konci srůstají, naopak Dyk (1946) je popisuje jako podvojná, od sebe oddělená. U samice nacházíme nepárovou gonádu – vaječník. Má tvar váčku s dutinou uprostřed, kam se uvolňují jikry při tření a pak postupují vejcovodem ven z břišní dutiny. Velikost gonád se mění jednak s věkem (dospívání), jednak sezónně (Švátora, 1986). Šimek (1954) popisuje uložení jiker v jediném vaječníku, souměrně uloženém naspodu břišní dutiny těsně pod kůží. Vnitřní prostor vaječníku je druhotně zvětšen příčně postavenými přepažujícími lištami (Baruš et al., 1995)

3.1.9 STANOVIŠTĚ A CHOVÁNÍ

Okouna můžeme nalézt v říčních ramenech, tůních, rybnících i přehradních nádržích, stejně jako v řekách nebo potocích včetně pstruhových. S oblibou vyhledává místa zarostlá vegetací, ale velcí okouni se zdržují v hlubší vodě a na mělčiny vyplouvají jen při lovu a

v době tření. Vystupuje až do podhůří, ale do prudce tekoucích a chladných pstruhových potoků jen vzácně. často můžeme pozorovat okouny, jak jsou shromážděni poblíž zarostlých míst, ponořených větví, kořenů nebo skal. Můžeme je přilákat i ponořením větve nebo smrčku do vody např. v přehradních zdržích. Zdržuje se obvykle při dně, při pronásledování malých rybek však vystupuje k hladině (Švátora, 1986). Šimek (1954) uvádí, že starší okouni jsou téměř výhradně hlubinnými rybami, jak to pozorujeme na přehradách a jezerech. Nemá-li okoun na některé vodě potřebnou hloubku, vyhledává alespoň co nejdokonalejší úkryt (strmé břehy, balvany, hráze, piloty, pilíře, roští, potopené stromy). Švátora (1986) uvádí, že okoun je schopen vplouvat do poměrně značných hloubek, z USA jsou uváděny úlovky až z hloubky 56m, z Evropy jsou známy úlovky z hloubky až 25m z Baltu, přičemž maximum úlovků bylo zaznamenáno z hloubky 2 – 5m. Největší množství okounů se většinou nacházelo nad nebo kolem oblasti termokliny a v našich podmínkách jsou okouni běžně odchytáváni např. v nádrži Klíčava do vrší umístěných v hloubce 8m. Zatímco Šimek (1954) píše, že okoun miluje spíš tvrdé než měkké dno, Švátora (1986) uvádí, že na kvalitu dna není příliš náročný a vyskytuje se jak v lokalitách s bahnitým dnem, tak i s písčítým, štěrkovitým nebo jílovitým. Tyto minimální požadavky umožňují okounům osidlovat nově vzniklé vodní nádrže nebo rybníky, přičemž není ani rozhodující, zda se v nádrži vyskytují převážně mělčiny nebo pouze strmé břehy. Coles (1981; in Baruš et al.; 1995) uvádí, že larvy okouna jsou pelagické a zdržují se v epilimniu. Mladí okouni před dosažením délky kolem 20 mm pak přestávají být pelagičtí a přemísťují se do pobřežních mělčin, kde během června až srpna vytvářejí velká hejna.

Okoun je stanovištní ryba (Švátora, 1986; Baruš et al., 1995), kromě podzimního uchycování do hlubších částí řek a ojedinělého pronikání do pstruhových vod nevykonává delší cesty z míst svého zrození (Dyk, 1946). Nejsou však ani vyloučeny individuální migrace na větší vzdálenosti. Vostradovský (1970, in Švátora; 1986) uvádí z Lipna úlovek okouna, který byl po označení chycen až na protilehlém konci nádrže, tj. ve vzdálenosti 36 km od místa značení, v nádrži Klíčava byl okoun prvé věkové skupiny zjištěn po dvou dnech ve vzdálenosti 5 km od místa značení.

Okoun žije v hejnech, kde se může nacházet až několik set jedinců najednou a jsou zde shromážděny většinou ryby stejné délky a podobného stáří. Za soumraku se hejna rozpadají a za svítání opět formují. Ve velkých jezerech vytváří okoun tzv. lokální populace, které se zdržují na volné vodě, kde vytváří rychle rostoucí formu, živící se dravě. V pobřežních partiích se zdržují jedinci pomalu rostoucí, kteří se živí z velké části benthickou nebo planktonní potravou (Švátora, 1986).

3.1.10 NÁROKY NA PROSTŘEDÍ

Okoun říční je typickým představitelem ryb eurytermních, tj. schopných přizpůsobit se značně odlišným teplotám prostředí. Je představitelem ryb vyskytujících se ve vodě klasifikované z hydrobiologického hlediska jako betamezosaprobni (Hartman et al., 1998). Fergusson (1958; in Švátora, 1986) uvádí, že okouni preferují teplotu 21 – 24°C. 31,4°C uvádí jako letální teplotu pro okouna říčního udává Jobling (1981; in Baruš et al., 1995). Teplota má vliv na životní pochody. Podle Pivničky (1981), probíhá v létě trávení u okouna až 3x rychleji než v zimě.

Co se obsahu kyslíku týče, popisuje Pivnička (1981) okouna jako druh, který se spokojí s obsahem kyslíku, pohybujícím se kolem $4 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$.

Schimenz (1955), zařazuje okouna mezi druhy ryb odolné proti kyselému pH (Bandt, 1954) mezi ryby málo odolné vůči vysokému pH (oba in Egert et al., 1984).

Okoun je schopen akceptovat salinitu až 1% a dokáže se pohybovat i v proudu až do rychlosti $45 - 60 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Dává přednost spíše místům méně osvětleným než silně osvětleným (Švátora, 1986).

3.1.11 VĚK A RŮST

Okoun říční je středně věká ryba, dožívající se 15 – 20 let, průměrný věk je 5 – 7 roků (Lusk et al., 1983). převážná většina jedinců se u nás dožívá věku mezi 6 – 8 roky. Mezi 6. až 8. rokem života začíná prudce vzrůstat mortalita ryb, v první řadě samců. Ve starších věkových skupinách nacházíme převážně samice (Švátora, 1986). Nejstarší okoun byl uloven v nádrži Mešno. Vostradovský (1961) určil jeho stáří na 19 let (Švátora, 1986; Baruš et al., 1995). Pospíšil (2000) uvádí jako nejvyšší doložený věk 20 let.

Okoun roste poměrně pomalu, zejména při přemnožení, kdy nemá dostatek potravy. V 1. roce života dosahuje 60 – 110 mm délky těla, ve 2. roce 80 – 115 mm, ve 3. roce 100 – 180 mm, ve 4. roce 120 – 210 mm, v 5. roce 150 – 250 mm, v 6. roce 160 – 260 mm, v 7. roce 180 – 270 mm a v 8. roce 200 až 400 mm. V našich podmínkách dorůstá délky až 510 mm a hmotnosti 4 – 5 kg (Lusk et al., 1983). Podle Švátory (1986) u nás okoun dorůstá v tekoucích vodách většinou celkové délky 150 – 300 mm a hmotnosti 0,2 až 0,5 kg. V přehradních nádržích nebo rybnících dosahuje hmotnosti kolem 1 kg. Šimek (1954) uvádí, že v přehradních nádržích dorůstají okouni neuvěřitelných vah 2 – 3 kg, ve Vranovském přehradním jezeře byl dokonce uloven exemplář 3,20 kg těžký.

3.1.12 POTRAVA

Potravu začíná okoun přijímat asi po 2 – 3 dnech po vylíhnutí (Frank, 1967; in Baruš et al., 1995), kdy se jeho celková délka pohybuje v rozmezí 6,0 – 9,6 mm (Lohinský 1970; in Švátora, 1986). V prvních dnech tvoří hlavní složku potravy vývojová stádia buchanek, drobné perloočky, vířníci, rozsivky, zelení bičíkovci, později (od 10 mm délky) pouze zooplankton. Od 15 – 18 mm délky požívá ojediněle i larvy pakomárů, které převažují při nedostatku zooplanktonu, výjimečně i larvy kaprovitých ryb. Od délky 28 mm nacházíme v potravě perloočky, hlavně větší druhy (jak planktonní, tak litorální), častěji i larvy pakomárů (různí autoři in Švátora, 1986 et in Baruš et al., 1995).

Potrava starších ryb je značně různorodá a její složení ovlivňuje především potravní nabídka řeky, rybníka nebo přehrady (Švátora, 1986). Lusk et al., (1983) uvádí, že menší jedinci se živí převážně zooplanktonem a v podstatě vším živým ve vodě, větší jedinci jsou dravci, přičemž ve velikosti nad 200 mm se živí již výučně menšími rybami, včetně vlastního potomstva. Švátora (1986) cituje různé autory, podle nichž se u jedinců větších než 70 mm v potravě ojediněle objevovaly ryby a jako převážně dravou rybu popisují okouna od 15 – 25 cm. Pokud se vyskytne nedostatek potravy, živí se okoun planktonem a bentosem po celý život. Dále uvádí u okouna jako velmi běžný kanibalismus, přičemž potěr okouna – jako složka potravy – může tvořit během letního období až 89% hmotnosti dospělých ryb. Množství potravy přijaté za den se pak během sezóny pohybuje mezi 3,2 – 6,5% jeho tělesné hmotnosti a klesá směrem k podzimu. Roční spotřebu potravy udává Pivnička (1981) pro různé věkové skupiny z Rybínské nádrže jako násobek hmotnosti: pohlavně nezralí jedinci 1,2 – 1,4; pohlavně dospělí jedinci 1,7 – 3,8. Musil, Adámek (2003) uvádí, že ve velikostní a věkové kategorii 2+ je příjem potravy okounů realizován především predací. Dále také odkazují na Holčíka (1967) v tom, že se u okouna výrazně projevuje kanibalismus a to i tehdy, poskytuje-li mu prostředí dostatek jiných malých ryb. Kanibalismus je běžný jev v přirozených i uměle chovaných populacích okouna říčního, zejména u ranných vývojových stádií Jeho podíl na celkovém úhynu může dosáhnout až 40% (Mélard et al., 1995; in Hillermann, 2002). V rybníčních chovech je významnou složkou potravy okouna střevlička východní (*Pseudorasbora parva*), jejíž preferenci před perlínem ostrobříchým (*Scardinius erythrophthalmus*) pokusně prokázali Musil et Adámek (2003), kteří rovněž citují Rajcharda (1995) zmiňujícího fakt, kdy po zavlečení střevličky východní v rybníčních soustavách došlo k výraznému zlepšení růstu okouna říčního.

3.1.13 REPRODUKCE

3.1.13.1 PŘIROZENÉ ROZMNOŽOVÁNÍ

Okoun říční dospívá v našich podmínkách velmi brzy. Samci dosahují pohlavní zralosti ve stáří 1 – 2 let, samice ve 2 – 3 letech (podle charakteru lokality). V našich klimatických podmínkách se vytírá od dubna do konce května, výjimečně do začátku června. Tření trvá 1 – 3 týdny při teplotách 5 – 14°C (Švátora, 1986). Dobu výtěru na duben až červen stanovují i Pospíšil (2000), Lusk et al., (1983), kteří teplotu při výtěru udávají 8 – 20°C, Dyk (1946) a Šimek (1954), kteří doplňují, že k výtěru dochází s oblibou v noci, respektive na jejím sklonku. Gillet et al. (1995) podrobně analyzoval vztahy mezi průběhem teplot a termíny přirozeného výtěru okouna v Ženevském jezeře ve Švýcarsku. Jikry okouna jsou 2 – 2,5 mm velké (Pospíšil, 2000); Vácha (2000), tuto velikost potvrzuje a relativní plodnost okouna uvádí 30 – 50 tis. jiker na 1 kg jikernačky. Lusk et al., (1983) uvádí relativní plodnost 80 – 250 tisíc jiker na 1 kg jikernačky. Absolutní plodnost je velmi variabilní a pohybuje se od 950 až do 300 000 jiker v závislosti na velikosti samice (Baruš et al., 1995). Dle Pivničky (1981) okoun patří mezi ryby fytofilní, to znamená, že odkládají jikry na ponořené rostliny, pokud jsou k dispozici, nebo na jiná ponořená tělesa (větve, kameny apod.). To koresponduje s popisem dalších autorů, samice v 1 – 2 metry dlouhých pásech na kameny, ponořené větve a kořeny, na vodní rostliny a jiné předměty pod vodou (Baruš et al., 1995; Lusk et al., 1983; Dyk, 1946). Egert et al., (1984) ve shodě s Luskem et al., (1983) uvádí, že plůdek se líhne za 14 – 17 dní, Pospíšil (2000) udává líhnutí za 130 – 160 denních stupňů.

3.1.13.2 ŘÍZENÁ REPRODUKCE OKOUNA

Dyk (1946) uvádí zmínku o umělém výtěru okouna, jež uskutečnil již v roce 1908 Rückl. Nověji ho popisují Flajshans et Göndör (1989). Okouny z podzimních výlovů přes zimu přechovávaných v kleci umístěné v hloubce 2,5 m přemístili do zastíněného žlabu, kde byly ryby odděleny přepážkou podle pohlaví a přikrmovány. Při dosažení teploty 7,5°C začala být prověřována výtěrová zralost. Samci pouštěli mlíčí velmi ochotně již při této teplotě. První jikernačky se vytřely při teplotě vody 13,5°C, další samice dozrávaly při 15 – 18°C. Oplozenost odhadli na 95%, pracovní plodnost samic 6,0 – 12,4 tis. ks jiker. Pokusy o narušení rosolovitých pásů a odlepování jiker byly neúspěšné. Délka inkubace při teplotách 14,9 – 21°C byla 150 – 191 D° (s vyšší teplotou se prodlužovala), mortalita na konci kulení se pohybovala od 45% při 14,9°C do 100% při 21°C.

Na konci devadesátých let byla optimalizace metod hormonálně indukované ovulace, poloumělého a umělého výtěru u okouna předmětem řady studií především polských a českých autorů. Polští autoři se orientovali spíše na použití gonadotropinů, příp. kombinovaných syntetických přípravků obsahujících analogy GnRH a dopaminergní inhibitor. Kucharczyk et al. (1996) uskutečnili umělý výtěr okouna říčního s použitím hormonální indukce ovulace jednak pomocí humánního choriogonadotropinu (hCG), jednak kapří hypofýzou s přídavkem nebo bez přídavku hCG. Skrypczak kol. (1998) popisují úspěšnou umělou ovulaci okouna říčního, při použití maďarského preparátu Ovopel, obsahujícího analog GnRH. Szcerbowski a kol. (1998) rovněž dosáhli výtěru jikernaček okouna říčního po aplikaci hCG (ve dvou dílčích dávkách 500 a 2 000 IU v intervalu 24 h) a jednorázového podání přípravku Ovopel.

Ve VÚRH JU ve Vodňanech (ve spolupráci s francouzským pracovištěm v Missilacu) byly rozpracovány především postupy založené na poloumělém a umělém hormonálně indukovaném výtěru pomocí dvou analogů GnRH. V případě jednorázového intramuskulárního injekčního podání přípravku Kobarelin (*desGly*¹⁰/*D-Ala*⁶/*mGnRH NHet*), byly nalezeny účinné dávky ve výši 125, resp. 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Kouřil a Linhart, 1997; Kouřil et al., 2002). Při aplikaci přípravku Supergestran s účinnou látkou Lecirelin (*desGly*¹⁰/*D-Tle*⁶/*mGnRH NHet*), byla efektivní dávka 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Kouřil et al., 2002). Při testování optimální teploty vody v rozpětí 13,3 – 17,9 °C při hormonálně indukovaném výtěru bylo nejvyššího podílu polouměle vytřených jikernaček (85 %) dosaženo při teplotě 16,3 °C, na rozdíl od ostatních testovaných teplot (55 - 65 %). Při opakování ve čtyřech různých teplotách v rozpětí 12,3 – 17,2 °C, bylo ale zjištěno, že umělý výtěr (na základě zjištění ovulace jikernaček) byl prováděn v průměru o 0,6 dne (o 14 h) dříve, než došlo k přirozenému výtěru jikernaček umístěných společně s mlíčáky. Nebyl pozorován vliv na snížení oplozenosti či líhivosti jiker. Oplozenost jiker byla ve většině případů velmi vysoká (> 95 %). Při opakovaných pokusech byl v průměru celkově zaznamenán vyšší podíl vytřených jikernaček při umělém výtěru (87 %), než při poloumělém výtěru (59 %). Výhodou poloumělého výtěru je menší pracnost. K inkubaci jiker se osvědčily klícky v průtočných betonových bazénech, akvária s výměnou vody a mírně průtočné mělké žlaby. Při inkubaci jiker není potřeba používat antimykotické koupele. Byla zjištěna vysoká povýtěrová mortalita především u mlíčáků – 62,5%, dvaapůlkrát více, než jikernaček (sledováno po poloumělém výtěru v průběhu jednoho následujícího měsíce), zřejmě v souvislosti s větší vnímavostí k manipulačnímu stresu (Kouřil a Linhart, 1997; Kouřil et al., 1997, 1998, 2001; Kouřil a Hamáčková, 1999, 2000). Byla vydána i metodická příručka postupů řízené reprodukce

okouna pro praxi s cílem podpory rozšíření produkce násadového materiálu okouna především v souvislostech s předpokládaným rozvojem intenzivního chovu tohoto druhu ryby (Kouřil et al., 2001).

Další experimenty francouzských výzkumníků s řízenou reprodukcí okouna byly zaměřeny na řízenou reprodukci okouna odchovaného v kontrolovaných podmínkách prostředí v mimovýtěrovém období. Migaud et al., (2002) provedli pokus, který probíhal v recirkulačním systému. Ukázalo se, že použití stabilního světelného dne 12h den a 12h noc a postupné snižování teploty z 21 °C na 6 °C ,v průběhu 6 týdnů, s následnou fází klidu, která trvá 5 měsíců při konstantní teplotě 6 °C, poskytne okounovi příznivé podmínky pro tvorbu gamet. Po dokončení vitellogeneze provedli zvýšení teploty z 6 °C na 21 °C v průběhu jednoho měsíce a ten samý teplotní skok v průběhu dvou měsíců. U teplotního programu, kde přechod teplot trval jeden měsíc, získali významně vyšší množství pohlavně zralých ryb. To nám dovoluje zkrátit reprodukční cyklus a získávat životaschopný plůdek i v jiném období než je běžné. Tyto výsledky také potvrdily, že hlavní úlohu při tvorbě a dozrávání pohlavních produktů hraje teplota.

3.2 SPERMA

3.2.1 SEMENNÁ PLASMA

Spermie jsou ve spermatu ryb s vnějším oplozením v prostředí semenné plasmy neaktivní. Hlavním úlohou semenné plasmy je vytvářet optimální prostředí pro spermie. Během uchovávání spermií je nutno zachovat jejich oplozovací schopnost, schopnost aktivace pohybu a životaschopnost (Alavi et al., 2007). Vnikem spermií do vodního prostředí dojde k velkému osmotickému skoku, při němž se uplatňují především ionty sodíku (Na^+), draslíku (K^+), hořčíku (Mg^{2+}) a vápníku (Ca^{2+}) u některých druhů, především lososovitých, má větší význam i koncentrace chloridových iontů (Cl^-). (Linhart, Šlechta, Slavík, 1991). Koncentrace těchto prvků je potom jedním z činitelů ovlivňujících rychlost a dobu pohyblivosti spermií, která je druhově velmi rozdílná a je závislá na mnoha vnějších i vnitřních faktorech. Tabulka 1. uvádí různé koncentrace klíčových anorganických složek v semenné plasmě v $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ a její variabilitu v závislosti na druhové diverzitě.

Tab. 1 Obsah vybraných iontů v semenné plasmě různých druhů ryb

Druh	Na+	K+	Mg ⁺⁺	Cl-	autor
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	104	25,3	1,1	135	Holtz et al. (1979)
	107	25,8	0,8		Holtz et al. (1977)
	133	20		130	Schlenk and Hahmann (1938)
<i>Oncorhynchus keta</i>	141	66	3,6	134	Morisawa et al. (1979)
<i>Salmo salar</i>	103	22	0,9		Hwang and Idler (1969)
<i>Salmo clarki</i>	107	38,6	1,5	156	Cruea (1969)
<i>Cyprinus carpio</i>	94	67,8	0,02		Clemens and Grant (1965)
<i>Vimba vimba</i>	107	38,7	1,2		Kusherova (1972)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	811	35,1	1,6		Gosh (1985)
<i>Stizostedion vitreum</i>	167	24,8		2 132	Gregory (1970)

3.2.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA SPERMIÍ RYB S VNĚJŠÍM OPLOZENÍM

Spermie se skládá ze tří částí: Hlavička, střední část (krček) a bičík. Hlavička má většinou vejčitý nebo kulovitý tvar o průměru ne větším než 5 μm v místě maximálního rozšíření. Střední část je taktéž malá, 2 – 4 μm na délku, a obsahuje jen několik mitochondrií, většinou 1 – 6. Spermie mohou být jednobíčíkaté či dvoubíčíkaté, přičemž délka bičíku je udávána od 30 – 40 μm (Alavi et al., 2007) Naproti tomu Baruš et. al. (1995) udávají hodnoty značně odlišné. Celkovou délku spermie jen 15 – 20 μm a průměr hlavičky jen 1-2 μm .

3.2.3 KONCENTRACE SPERMIÍ

Hustota spermií je velmi variabilní v závislosti na druhu. U kapra dosahuje hodnot 14 až 35 x 10⁹/ ml (Linhart O., Pokorný J., 1984) *Dicentrarchus labrax* má hustotu spermií až 50 x 10⁹/ ml, pstruh 5 až 15 x 10⁹/ ml a jeseter od 0,1 – 4 x 10⁹/ ml (Alavi et al., 2007) lín 5 – 34 x 10⁹/ ml, štika 10 – 30 x 10⁹/ ml (Linhart O., Pokorný J., 1984). Poněvadž je sperma pro potřebu stanovení množství spermií příliš husté je třeba jej naředit. Nejčastěji používá dvou krokovou metodu ředění. V první fázi se naředí v poměru 1 : 50 neaktivačním roztokem. Poté je sperma opět naředěno dle potřeby. Tato metoda vyžaduje jisté znalosti a zkušenosti. (Alavi et al., 2007). Je často nezbytné znát alespoň základní hodnoty semenné plasmy pro daný druh, jako je koncentrace draslíku a osmoalita (Rodina et al. 2004).

3.2.4 POHYBLIVOST SPERMIÍ

Po aktivaci dochází k pohybu bičíku a je využíván ATP. Jak se zásoby pomalu vyčerpávají, pohyb se zpomaluje až úplně ustane. Doba pohyblivosti je různá v závislosti na podmínkách a druhu. Např. u pstruha potočního (*Salmo trutta m. phario L.*) se spermie po přidání vody začne pohybovat nejprve rychlostí 130 $\mu\text{m/s}$. Po uplynutí 15 vteřin se jejich rychlost snižuje na 44 $\mu\text{m/s}$ a po uplynutí dalších 15 – 20 s pohyb ustává úplně (Baruš et al., 1995). Pro orientaci a srovnání uvádím i několik dalších příkladů: hlavatka podunajská (*Hucho hucho L.*) 45s, parma obecná (*Barbus barbus L.*) 1-2 minuty, kapr obecný (*Cyprinus carpio L.*) až 5 minut (Baruš et al., 1995).

3.3. CHARAKTERISTIKA SPERMIÍ OKOUNA ŘÍČNÍHO

Spermie okouna jsou jedno bičíkaté, asymetrické a bez akrozomu. Mají jasně ohraničenou ovoidní hlavičku, střední část a bičík, přičemž bičík přiléhá mediolaterálně na hlavičku (Lahnsteiner et al., 1995)

Ve velmi kvalitních vzorcích dosahuje pohyblivost spermií až 35 sekund a rychlost pohybu se pohybuje kolem 130 $\mu\text{m/s}$, jedná se o průměrné hodnoty (Alavi et al., 2007). Alavi et al. (2007) zmiňuje procentuální pohyblivost a rychlost pohybu spermií čísla 91.90 ± 1.27 (%) a 115.54 ± 1.25 ($\mu\text{m/s}$) Pohyblivost spermií aktivovaných 10°C destilovanou vodou dále charakterizuje Lahnsteiner et al. (1995) následovně: : 85.0 +/- 2.7% spermií je aktivních, hlavní směr pohybu (10 +/- 1 s po aktivaci) je rovný (61.4 +/- 24.4%) a průměrná rychlost je 122.4 +/- 21.9 $\mu\text{m/s}$. Optimální pH je mezi 7.0 a 8.5. Semenná plasma obsahuje: 124.01 +/- 21.68 mmol l(-1) sodíku, 10.22 +/- 1.11 mmol l(-1) draslíku a 0.72 +/- 0.26 mmol l(-1) vápníku. pH je 8.25 +/- 0.09, a osmolalita 283.90 +/- 37.19 mmol kg(-1)

Alavi et al.(2007) udávají rozměry hlavičky 1, 87 μm axiálně a 1,78 μm laterálně. Střední část obsahuje jen jednu mitochondrii. Délka bičíku se pohybuje mezi 30 – 35 μm , šířka je 0,7 – 0,9 μm . (Alavi et al., 2007).

Osmolitu a složení semenné plasmy okouna říčního popisuje Alavi et al. (2007) následovně: osmolalita dosahuje hodnoty $298,07 \pm 5,09$ mOsm/kg, koncentrace sodíku, chloridových iontů, draslíku a vápenatých iontů (mM) se pohybuje v hodnotách 130.97 ± 2.19 , 106.75 ± 2.37 , 10.70 ± 0.61 a 2.41 ± 0.09 .

4. MATERIÁL A METODIKA

K práci bylo použito 60 ks okouna říčního z chovu VÚRH ve Vodňanech a z odlovů ve volných vodách. Jedná se především o mladé, 2 – 3 leté jedince. Práce je rozdělena na tři části:

- 1) Odebrání vzorků v terénu, fixace vzorku krve popis.
- 2) Práce v laboratoři, vlastní rozборы, dodatečné ředění a fixace některých vzorků.
- 3) Statistické vyhodnocení výsledků

Odebírání vzorků probíhalo na líhni VÚRH ve Vodňanech 4. 4. 2004 a 7. – 14. 4. 2005. Ryby byly změřeny a zváženy. Injekčními stříkačkami o $V = 5$ ml bylo odebráno sperma od ryb připravených k výtěru. Nebyla použita žádná hormonální ani řízená teplotní stimulace. Všem testovaným rybám byla odebrána krev do heparinem vypláchnuté stříkačky Heparin zabraňuje srážení (Svobodová, 1986). Objem odebraného vzorku nebyl nikdy vyšší než 0,2ml. Vzorek krve byl okamžitě fixován ethanolem v 2ml Eppendorf zkumavce. Krev byla odebrána ze hřbetní aorty na počátku ocasního násadce.

Každé rybě se kvůli stanovení věku odebraly 2 - 3 šupiny z místa mezi postranní čarou a počátkem první hřbetní ploutve (u okouna je to místo, kde se šupiny zakládají jako první).

V laboratořích na VÚRH se vzorky spermatu ředily a fixovaly na příslušné testy a vyhodnocení. Měřila se osmoalita, spermatokrit, množství DNA v krvi a spermiích, počítala koncentrace a poměr živých a mrtvých spermií stanovených metodou dvojího barvení. Tato metoda využívá dvojího barvení, přičemž barvivo SYBR 14 proniká živou buňkou a váže se na DNA. Tyto buňky se jeví pod fluorescenčním mikroskopem jako zelené body. Naproti tomu druhé barvivo – propidium iodid neproniká přes membránu živé buňky, ale váže se na DNA mrtvých. Ty jsou potom při pozorování zabarveny červeně. Analýzou obrazu (program micro image) je vyhodnoceno % ž/m spermií. Tato metoda byla úspěšně použita při stanovování ž/m spermií býků, včel, králíků, myší aj. Z ryb byla využita u lína obecného (*Tinca tinca*), jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a sumce velkého (*Silurus glanis*) (Flajšhans et al., 2004)

4.1 FIXACE VZORKU PRO POČÍTÁNÍ KONCENTRACE SPERMIIÍ:

Do Eppendorf zkumavky bylo napipetováno 10 μ l spermatu a 990 μ l fyziologického roztoku. Vzorek se protřepal a přidal se 1ml formaldehydu. Z takto fixovaného vzorku se následně odebralo 200 μ l, které se dále naředily 800 μ l fyziologického roztoku.

4.2 MĚŘENÍ OSMOALITY:

Měření osmolality (mosmol/l) probíhalo na přístroji Wescor Vapro 5520 Vapor pressure osmometer (Wescor Inc., USA) Postup byl dle doporučení výrobce.

4.3 MĚŘENÍ SPERMATOKRITU:

Měření bylo prováděno na hematokritové odstředivce MPW-52 s použitím hematokritových kapilár. Do nich bylo hadičkou nataženou sperma a na přístroji bylo nastaveno 10 000ot/min, časovač byl nastaven na 5 minut. Po uplynulé době byly kapiláry vyjmuty z odstředivky a na vyhodnocovací desce byly odečteny hodnoty spermatokritu. Měření spočívalo ve zjištění % poměru pevných částic (spermií) a tekuté složky spermatu (semenné plasmy).

4.4. URČENÍ VĚKU RYB

K určení věku ryb bylo použito vzorků šupin jednotlivých ryb, vždy v počtu 2-3 z místa mezi postranní čarou a počátkem první hřbetní ploutve. Z těchto byl potom pod binolupou odečten počet anulů. Každý byl zaznamenán jako jedno uplynulé vegetační období.

4.5 FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ Ž/M SPERMIÍ POMOCÍ METODY DVOJÍHO BARVENÍ:

Příprava vzorku spermatu k fluorescenčnímu stanovení: Do zkumavky Eppendorf bylo napipetováno 990 μ l fyziologického roztoku s 10 μ l spermatu a následně dobře protřepáno.

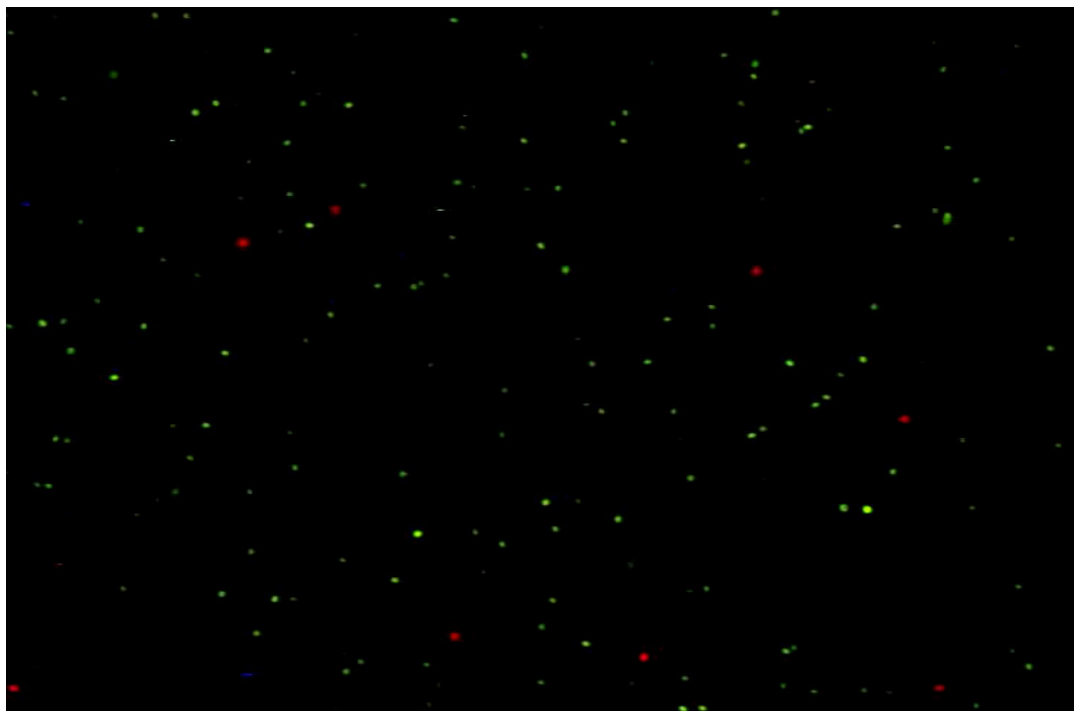
4.5.1 POSTUP STANOVENÍ Ž/M SPERMIÍ:

Jeden mililitr dříve připraveného vzorku spermatu byl přemístěn do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a uložen k ledu ($t = 0 - 4$ °C). Metoda dvojího barvení byla provedena za použití soupravy pro stanovení živých a mrtvých spermií (Molecular Probes Inc., USA), obsahující zásobní roztok zeleného fluorescenčního barviva SYBR 14 (100 μ l 1mM roztoku v DMSO), které prochází neporušenou membránou buněk a roztok červeného fluorescenčního barviva propidium iodidu (5ml 2,4 mM vodného roztoku), které prochází pouze porušenou membránou odumírajících nebo mrtvých buněk. Postup stanovení byl následující. 1 μ l zásobního roztoku SYBRu byl naředěn 49 μ l fyziologického roztoku a uložen k ledu do tmy. 5 μ l předředěného SYBRu 14 bylo pipetováno do 1ml vzorku spermatu spolu s 5 μ l PI. Vzorek byl opatrně zamíchán. 30 μ l (o 10 μ l více než u ostatních druhů ryb; Flajšhans, osobní

doporučení) bylo bezprostředně napipetováno na čisté podložní, mikroskopické sklíčko. Krouživým pohybem konusu pipety po povrchu sklíčka bylo dosaženo široké ploché kapky (Flajšhans et al., 2004). Nebylo použito žádného krycího skla, aby nemohlo dojít ke zkreslení výsledků Brownovým pohybem buněk.

Sklíčko bylo umístěno pod fluorescenční mikroskop Olympus BX 60, který byl předzaostřen na povrch sklíčka. Epifluorescenční mikroskopie využívá 100 W Ushio rtuťovou lampu, MWB filtrovou kostku (širokopásmová, modrá excitace 450 – 480 nm, emise nad 515nm) a objektivy Olympus Plan 20x nebo UPlan 40x.

Vzorek byl ponechán 8 minut od nanesení sedimentovat při pokojové teplotě v temnu, aby došlo k usazení spermií na povrch skla a zároveň byl ukončen veškerý samovolný pohyb buněk ve vzorku. Fázový kontrast i fluorescenční obrázky byly zaznamenávány barevnou kamerou 3CCD Sony DXC-9100P a uloženy pomocí softwaru Olympus MicroImage v. 4.0. Z každého vzorku bylo zaznamenáno několik různých zorných polí. Vzhledem k rychlému blednutí fluorescenčních barviv nebylo možno zaznamenávat pole déle než 1,2 minuty. Aby došlo k zvýšení jasnosti fluorescenčního obrazového signálu, byla clona CCD kamery upravena na 0,16s namísto původních 0,04s (Flajšhans et al., 2004) Od každého vzorku bylo pořízeno min. 5 polí tak, aby celkový počet bodů (spermií) převyšoval nebo se blížil číslu 1000.



Obr. 1 Vzorek obarvených ž/m spermií

4.5.2 VYHODNOCOVÁNÍ POMĚRU Ž/M SPERMIÍ:

Poměr živých a mrtvých spermií byl vyhodnocován za použití softwaru Olympus MicroImage v. 4.0. K rozlišení ž/m spermií bylo použito dvojího prahování. Živé spermie (zeleně zabarvené body) byly pro vyhodnocení označeny žlutou barvou (třída 1). Mrtvé byly označeny modře (třída 2). Ručním nastavením citlivosti pro každou barvu a označením jednotlivých bodů se docílilo co nejdokonalějšího spočítání bodů (spermií). Body ležící na hranici snímku nebyly do celkového počtu započítány (Flajšhans et al., 2004). Pomocí funkce „Ranges Statistics“ byl spočítán celkový počet bodů (spermií) a zároveň jejich počet v 1. a 2. třídě. Vyhodnocení bylo znázorněno v tabulce jak počtem bodů (spermií) tak jejich procentuálním vyjádřením (Flajšhans et al., 2004). Získaná data byla následně uložena v programu Microsoft Office Excel 2003 kde bylo posléze vytvořeny příslušné grafy. Pro další zpracování byla data importována do programu Statistika CZ v.6.0 a programu Statgraphics v 5.0 . Na závěr byly všechny výsledky seříděny a zpracovány do výsledných grafů, vyjadřující průměry živých spermií jednotlivých vzorků, jejich celkový průměr, směrodatné odchylky a variabilitu mezi jednotlivými vzorky i mezi roky odběru

5. VLASTNÍ VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Byly odebrány vzorky od 60 ks okouna říčního. U vzorků 1 - 6 nebyl stanoven spermatokrit, u vzorků 3 - 6 se nepodařilo stanovit osmoalita a u vzorků 36 - 45 nebyla počítána koncentrace spermií. Tyto vzorky nebyly zahrnuty do pozdějšího vyhodnocení.

Tab. 2 Přehled získaných měření

vzorek č.	věk (roky)	CDT(mm)	m(g)	V spermatu (ml)	spermatokrit (%)	c ($10^9/\text{mm}^3$)	osmoalita
1	3	263	208	1,8	neměřen	27	288
2	3	238	149	2,3	neměřen	50	305
3	3	235	139	2,8	neměřen	48	neměřena
4	3	254	125	2,6	neměřen	78	neměřena
5	3	192	98	0,8	neměřen	50	neměřena
6	4	201	115	1	neměřen	34	neměřena
7	3	267	139	8,1	86	85	304
8	3	183	126	7	92	45	292
9	3	271	130	4	85	39	301
10	3	168	103	9	93	58	279
11	3	235	142	6	97	94	308
12	3	174	99	1	83	55	285
13	3	185	105	3,5	98	51	302
14	3	212	112	6	97	40	270
15	2	132	24,2	1	63	50	294
16	2	130	21,7	2	62,5	48,75	288
17	2	138	28,2	1	76	39,375	306
18	2	142	29,9	1,2	74	57,5	295
19	3	144	29,3	0,6	62	53,125	287
20	3	140	26,7	1,6	68	95	290
21	2	132	21,5	1,2	71	51,875	322
22	2	133	22,9	1,2	61,3	49,375	305
23	2	131	24,6	0,8	61,5	47,5	294
24	2	117	10,9	0,5	68	55	286
25	3	139	27	0,6	72	43,125	287
26	2	127	21,4	0,8	90	82,5	381*
27	2	134	21,9	0,9	63	50,625	305
28	3	140	26,6	2	64	46,25	295
29	3	143	28,8	1,8	67	68,75	335
30	2	113	12,6	0,8	83	50	451*
31	3	140	16,4	1,1	71	39,375	294
32	2	145	18,5	1,2	61	40,625	293
33	2	135	21	0,8	78	40	293
34	2	120	18,3	0,5	69	41,875	293
35	2	135	22,8	0,9	66	37,5	294
36	2	267	243	1,9	62	nepočítána	304
37	2	272	280	1,6	74	nepočítána	324

38	2	224	144	0,8	77,5	nepočítána	385*
39	2	243	180	1	88	nepočítána	389*
40	2	146	31	0,3	52,5	nepočítána	212
41	2	235	178	1,6	61	nepočítána	308
42	2	129	23	0,6	82	nepočítána	348
43	2	150	34	0,7	51,5	nepočítána	329
44	2	151	27	0,3	71	nepočítána	306
45	2	139	29	0,8	67	nepočítána	279
46	2	130	21	1,4	61	65,625	302
47	2	139	27,1	0,8	75	55	290
48	2	138	25,9	1,6	60,5	62,5	323
49	2	139	26,1	1	68	43,75	178
50	3	148	35,6	2,4	48	38,75	182
51	3	150	33,9	1,4	75	43,125	360
52	2	141	26	1,7	66	51,25	298
53	2	135	24,8	1,4	77,5	63,75	338
54	2	131	22,1	1,6	63	45,625	275
55	3	217	137,5	2	79,5	38,125	298
56	3	130	22	0,9	55	45,625	227
57	2	137	28	1,2	61,5	35,625	293
58	3	128	22,7	0,8	77	95	293
59	3	130	25,5	1,2	62	48,125	300
60	3	135	31,6	0,4	63	57,5	280

* vzorky byly kontaminovány krví při odběru, tyto hodnoty nebyly započítány do výsledků

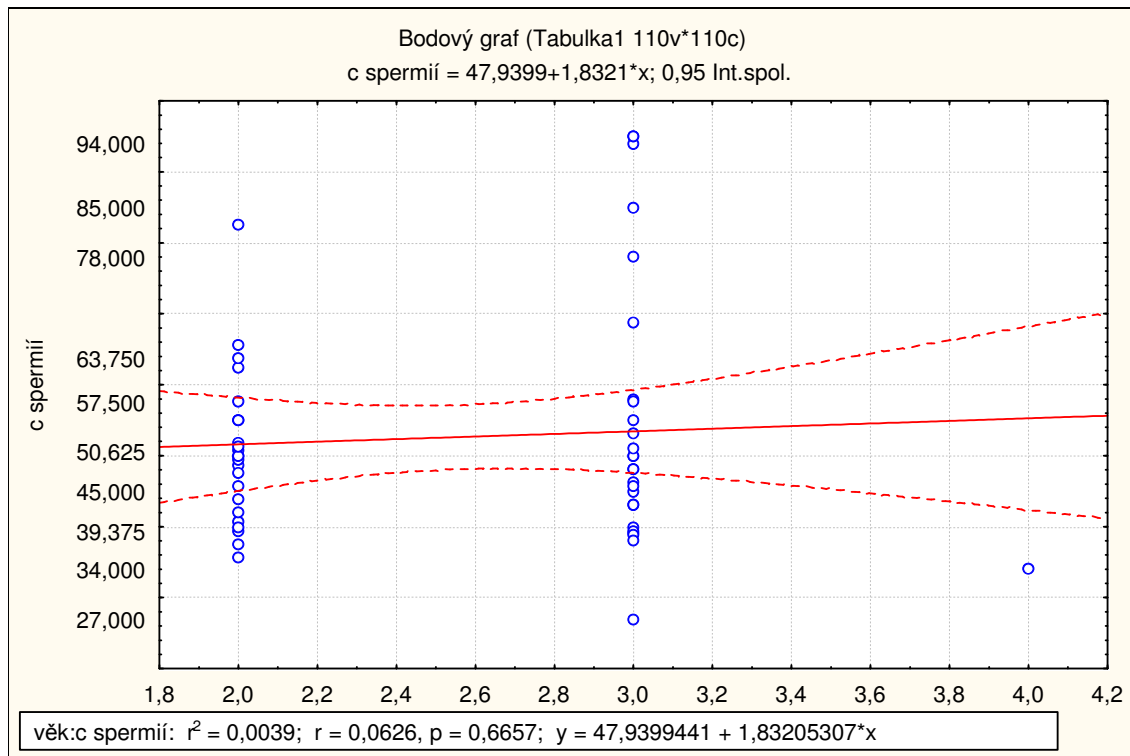
Tab. 3 Shrnutí vybraných hodnot základních charakteristik

	CDT(mm)	m(g)	V spermatu (ml)	spermatokryt (%)	c spermií (10 ⁹ /ml)	osmoalita
průměr	166,2	65,73333	1,796666667	71,4962963	52,63	293,01923
maximum	272	280	9	98	95	360
minimum	113	10,9	0,3	48	27	178
smodch	47,4239	64,17055	1,816311892	11,95364446	15,65692658	32,590401

5.1 KONCENTRACE SPERMÍÍ

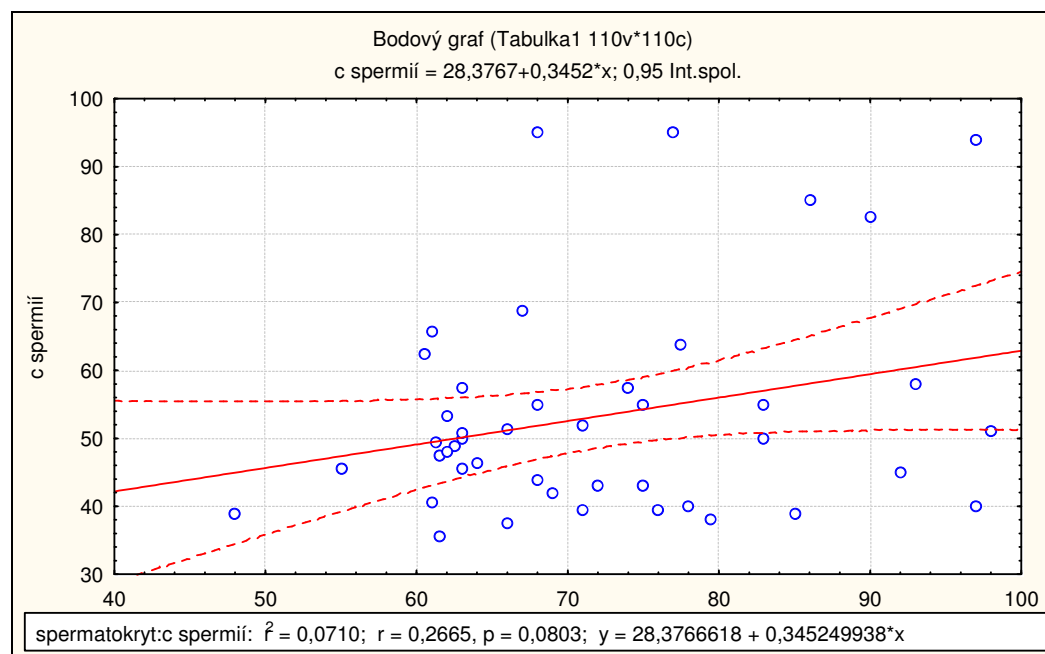
Graf 1

Závislost koncentrace spermíí na věku.



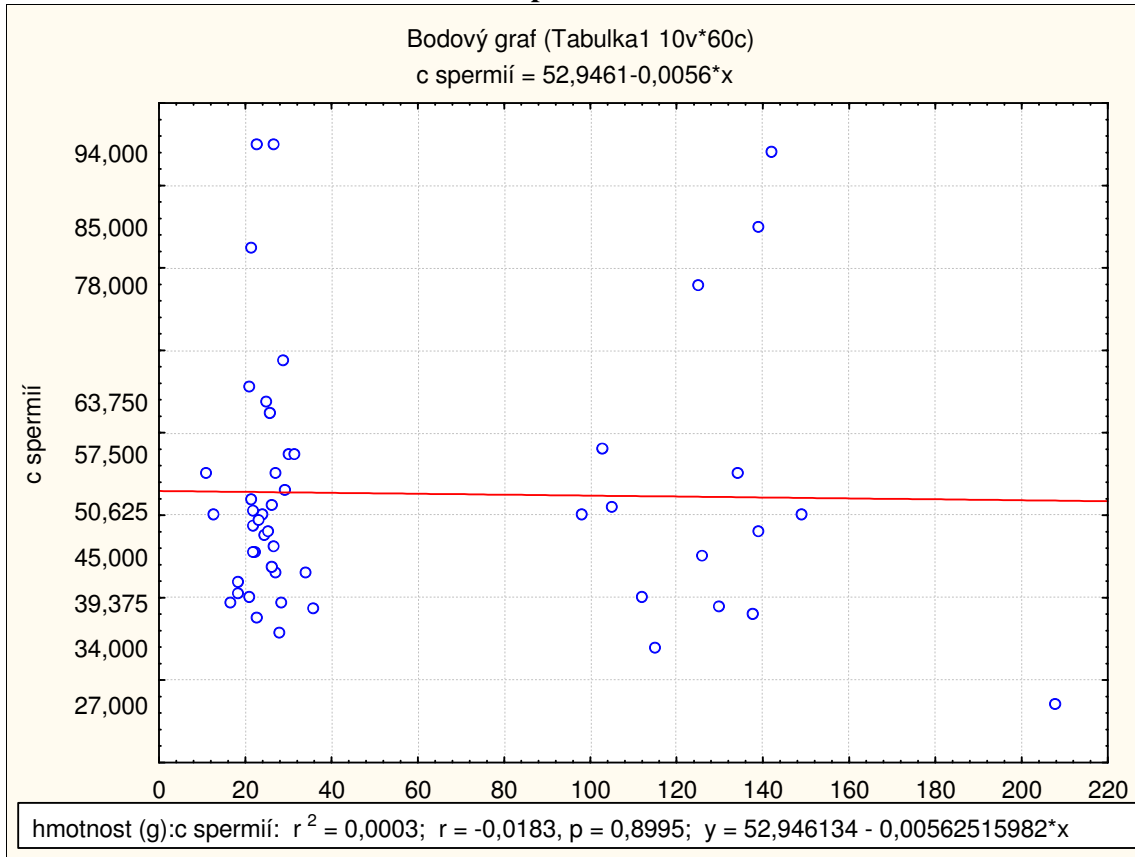
Graf 2

Závislost koncentrace spermíí na spermatokritu



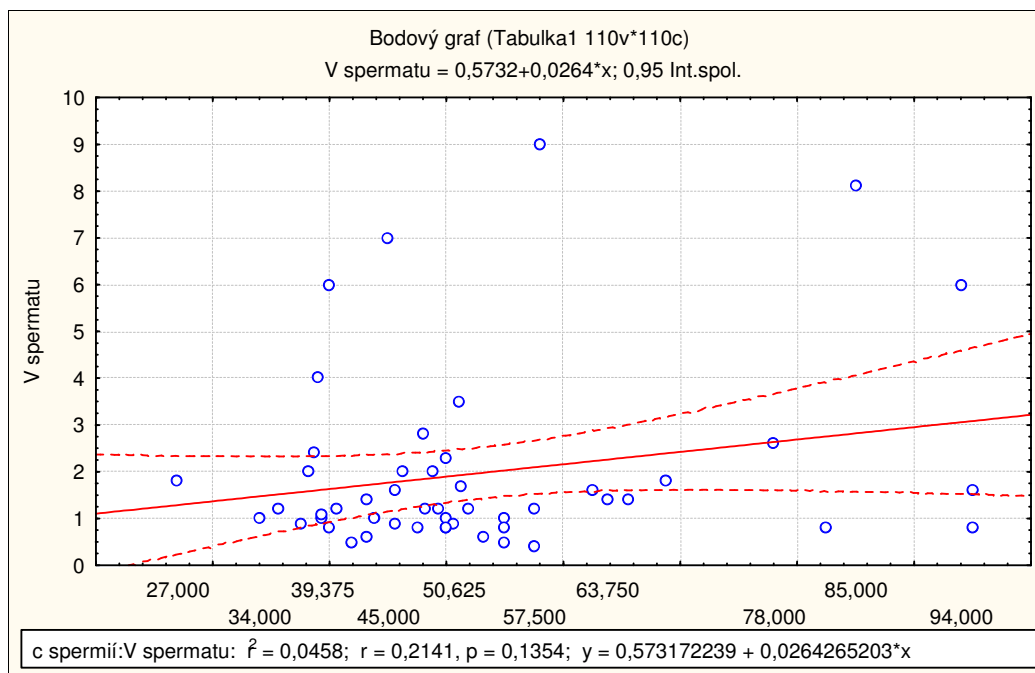
Graf 3

Závislost c spermií na hmotnosti



Graf 4

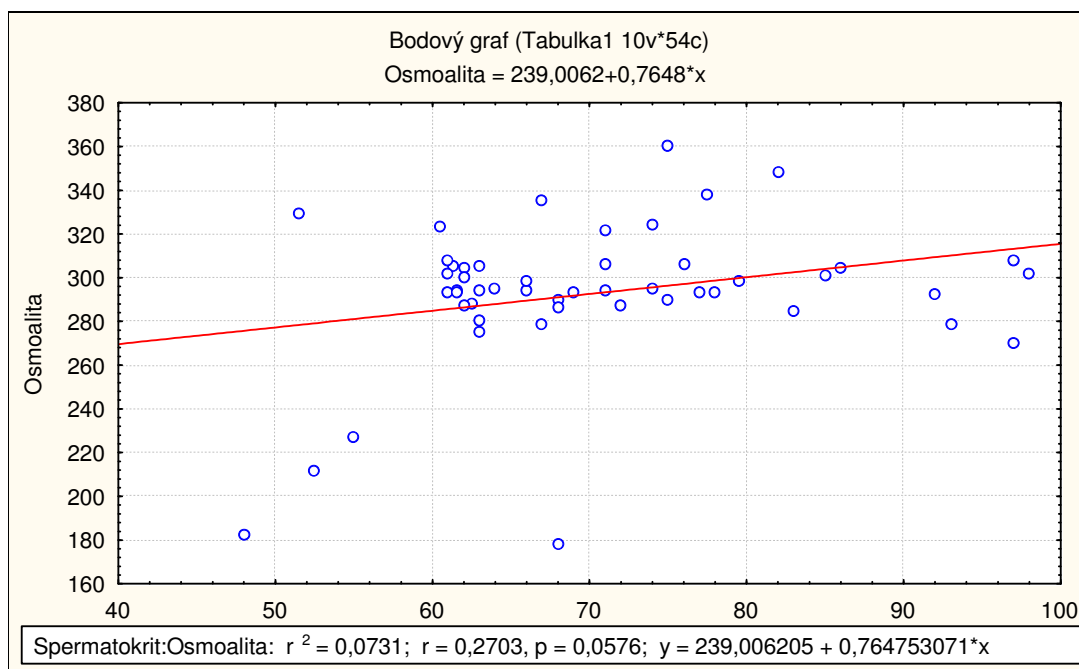
Závislost objemu spermatu na koncentraci spermií



5.2 OSMOALITA

Graf 5

Závislost osmoality na spermatokritu



5.3 FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ ŽIVÝCH/MRTVÝCH SPERMII

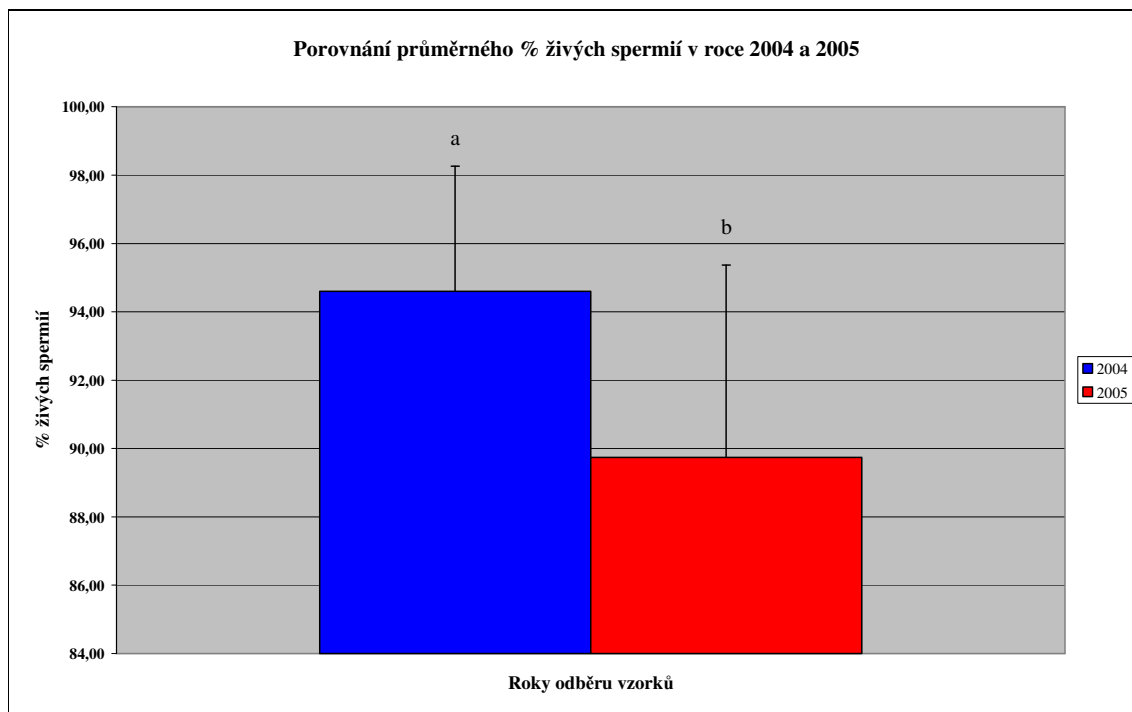
Tab. 4 Celkové hodnoty ze souboru - rok 2004

Počet testovaných souborů	14
živé	18556
mrtvé	501
průměr živé(%)	94,59666
max živé	99,92
min živé	92,72
smodch	2,3
průměr mrtv.(%)	3,776429
max mrtv.	7,28
min mrtv.	0,08
smodch	4,865

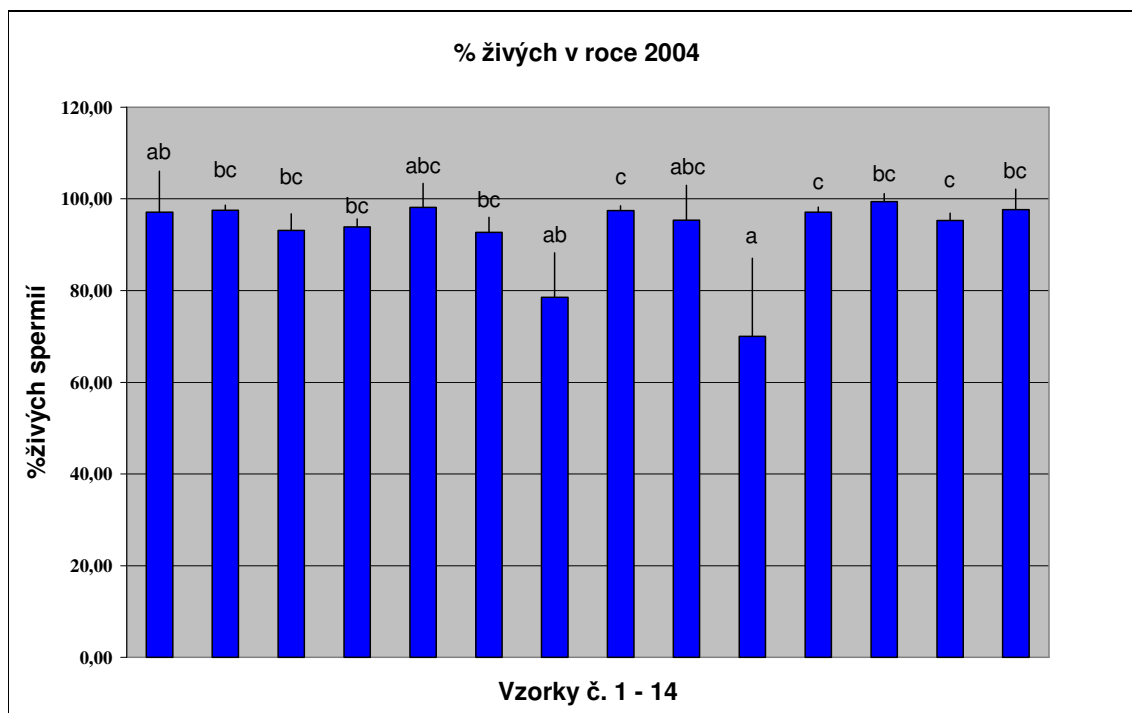
Tab. 5 Celkové hodnoty ze souboru - rok 2005

Počet testovaných souborů	21
živé	31006
mrtvé	2956
průměr živé(%)	89,74112379
max živé	94,3056769
min živé	83,87390919
smodch	3,737143
průměr mrtv.(%)	10,2588764
max mrtv.	5,69432
min mrtv.	16,12609
smodch	3,737143

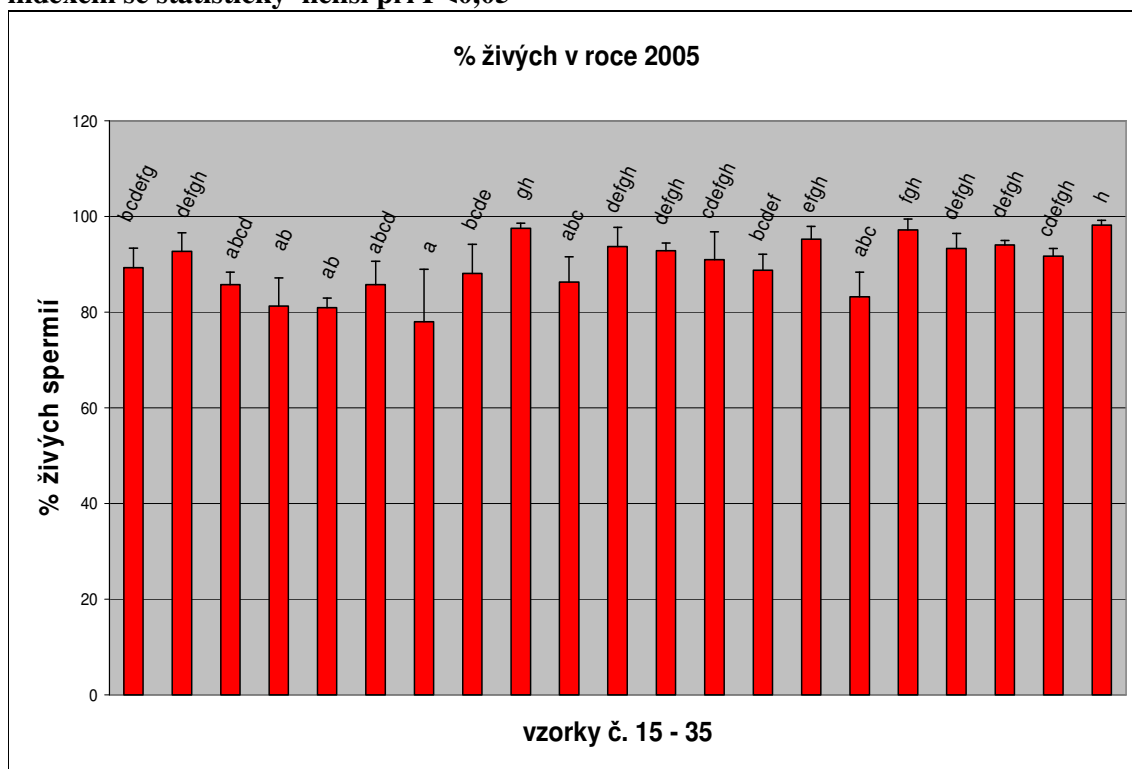
Graf 6 Porovnání průměrného % živých spermií v roce 2004 a 2005 , skupiny se stejným abecedním indexem se statisticky neliší při $P < 0,05$.

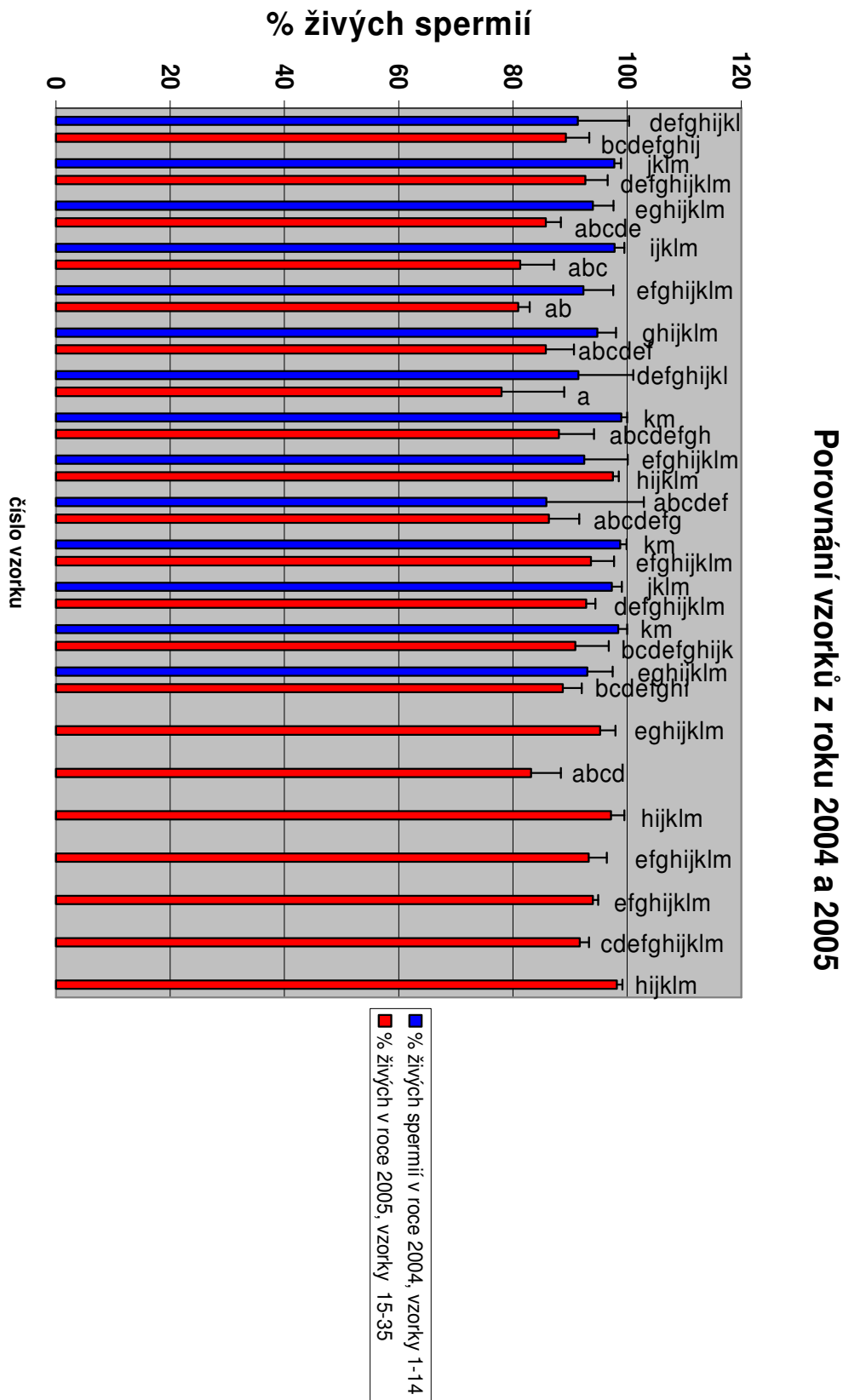


Graf 7 Porovnání % živých spermií v roce 2004, skupiny se stejným abecedním indexem se statisticky neliší při $P < 0,05$.



Graf 8 Porovnání % živých spermií v roce 2005, skupiny se stejným abecedním indexem se statisticky neliší při $P < 0,05$.





Graf 9 Porovnání % živých spermii všech odebraných vzorků, skupiny se stejným abecedním indexem se statisticky neliší při $P < 0,05$.

6. DISKUZE

Koncentraci spermií udává Wirtz et al.(2006) jako průměrnou hodnotu $53,6 \times 10^9$ /ml přičemž minimální a maximální hodnoty dosahují čísel $18,8 \times 10^9$ /ml a $127,5 \times 10^9$ /ml. Naproti tomu Alavi et al.(2007) uvádí průměrnou koncentraci spermatu okouna říčního $29,19 \times 10^9$ /ml $\pm 3,15$. Minimum a maximum získané naším měřením dosahují hodnot 27×10^9 /ml a 95×10^9 /ml, přičemž průměr získaný odběrem 50 vzorků činí $52,63 \times 10^9$ /ml $\pm 15,66$.

Vzorky Wirtze et. al (2006) byly odebírány téměř ve stejné době jako vzorky, jimiž se zabývá naše studie. Proto veliká podobnost výsledků není nijak překvapující. Alavi et al.(2007) pracoval sice s novějšími vzorky, nicméně rozdíl je natolik markantní, že se přímo nabízí otázka, zda nedošlo během počítání či vyhodnocování k nějaké zásadní chybě. Námi získaná hodnota potvrdila očekávání, které se rýsovalo během počítání koncentrace jednotlivých vzorků spermatu

Lahnsteiner et al.(1995) publikuje osmolitu spermatu okouna říčního jako $283,90 \pm 37,19$ mosmol / kg. Námi zjištěný údaj $293,02 \pm 32,59$ mosmol/kg se však více blíží hodnotě $298,07 \pm 5,09$ mosmol/kg dosažené Alavim et al.(2007). Zajímavé je porovnání směrodatné odchylky, jejíž hodnota je u stávajících vzorků více než 6 x vyšší než u vzorků zpracovaných v roce 2007. Dalo by se spekulovat, zda nedošlo k nepřesnostem během měření, nicméně všechna proběhla přesně dle doporučeného postupu výrobce osmometru (Wescor Inc., USA). Nepřesnost také částečně vylučuje podobná hodnota získaná při pokusu v roce 1995. Veliký rozdíl by mohla vysvětlovat skutečnost, že při pokusu v roce 2007 byly k dispozici vzorky z jedné populace, zatímco k této studii byly použity vysoce reprezentativní vzorky ryb získaných z mnoha lokalit.

Porovnat spermatokrit okouna říčního s některým z předchozích měření není možné, poněvadž se nepodařilo vyhledat žádná publikovaná měření. Byla však provedena měření spermatokritu jiných druhů. Variabilita těchto měření je tak veliká, že jsou zde uvedena jen jako zajímavost. V roce 2006 byl publikován spermatokrit jesetera perského (*Acipenser persicus*). Zjištěná hodnota byla velmi nízká a to 6,22% (Noveiri et al., 2006) naproti tomu hodnota spermatokritu druhu *Hippoglossus hippoglossus* je uváděna 99% (Tvedt et al., 2001) U okouna říčního se měření pohybovala od 40 do 98%, přičemž průměr z 54 zaznamenaných měření činí $71,5\% \pm 11,05$, což koreluje s vizuálním hodnocením spermatu, kde lze sperma označit jako „velmi husté“. Marně však byla hledána souvislost mezi spermatokritem a koncentrací spermií. Původní vize se zabývala myšlenkou souvislosti, nicméně z grafu č. 2 je zřejmé, že k žádné takové spojitosti zde nedošlo.

Fluorescenční hodnocení živých a mrtvých spermií pomocí dvojího barvení (Flajšhans et al., 2004) bylo sice prováděno na několika druzích sladkovodních ryb, nikoliv však na okounovi říčním. Hodnoty pro kapra obecného, lína obecného, sumce velkého a jesetera sibiřského jsou následující: 93.92% ± 0.89% až 97.02% ± 3.50%, 76.14% ± 3.87% až 97.76% ± 0.79%, 79.45% ± 3.83% až 83.76% ± 1.35%, 83.56% ± 3.83% až 94.59% ± 1.02% (Flajšhans et al., 2004). Pro okouna byl zjištěn rozsah 78,005% ± 10,96% až 98,969% ± 1,064%. Vzorek s nižším % živých spermií byl zároveň ze souboru vzorků z roku 2005, které měly celkově nižší % živých spermií (89,741% ± 3,737% z roku 2005 oproti 94,59666 ± 4,865 % z roku 2004) Zdálo by se, že vyšší mortalita spermií může být způsobena např. nižším věkem (ne zcela dokončený vývoj testes), nižší hmotností (nedostatečná potravní nabídka a následný nedokonalý vývoj spermií). Nebo naopak, kompenzace v podobě vyššího objemu spermatu, to by mělo ovšem za následek změnu v závislosti koncentrace spermií na objemu. Z grafu č. 4 je však jasně patrné, že tato závislost nebyla prokázána. Stejně tak nebyla prokázána závislost mezi hmotností a koncentrací spermií.

Podíváme-li se blíže na srovnání výsledků z roku 2004 a 2005 je zřejmý markantní rozdíl v % živých spermií. Tato rozdílnost byla statisticky prokázána na úrovni $P < 0,05$. Ryby z odběru v roce 2004 byly tříleté, vyjma jedné, u které byl věk stanoven na čtyři roky. V roce 2005 tvořily většinu vzorků ryby ve druhém roce věku (15 ks z celkového počtu 21 vzorků). Pohlavní dospívání okouna říčního uvádí Baruš et al.(1995) ve druhém až třetím roce života. Zároveň však upozorňuje na velikou variabilitu, kdy se podařilo zjistit pohlavní dospělost některých jedinců až v šesti letech. Vysoká variabilita byla pozorována mezi vzorky ž/m spermií v roce 2005. Kromě vlivu věku by tyto rozdíly mohly být způsobeny pestrá genetickou základnou jedinců, kdy byl vzhledem k rozmanitosti lokalit k dispozici vzorek z mnoha různých populací. Posoudit vnější vlivy na % živých spermií není dost dobře možné, poněvadž ryby byly získány z velkého počtu lokalit, jejichž přesné názvy a způsob hospodaření včetně chované obsádky se nepodařilo vyhledat. Vzorky hned po dopravě na líheň VÚRH umísťovali z kapacitních důvodů do jednoho, společného, žlabu. V tomto žlabu byly drženy až do odběru (cca 14 dní) při krmení drobnými rybami 1 x za 2 dny. Je třeba také zohlednit % nasycení kyslíkem, kdy v době držení ryb mohlo docházet ke značným výkyvům teplot a problémům s tím spojených. Vzhledem k poměrně dlouhé prodlevě mezi odlovem a odběrem je na místě neopomenout i faktor stresu, kdy při kontrole připravenosti k výtěru bylo rybami manipulováno.

7. Souhrn

V provedené studii byly odebrány vzorky od 60 ks samců okouna říčního, *Perca fluviatilis* ve věku od 2 do 4 let a o průměrné hmotnosti 51,2 g u dvou-, 82,25 g u tří a 115 g u čtyřletých ryb, u nichž byly stanoveny následující základní kvalitativní a kvantitativní charakteristiky. Byla zjištěna průměrná koncentrace spermií $52,63 \times 10^9$. Nebyla prokázána závislost koncentrace spermií na věku ($r = 0,06$; $P = 0,67$), spermatokritu ($r = 0,2$; $P = 0,08$), objemu spermatu ($r = 0,21$; $P = 0,14$) ani na hmotnosti ryby ($r = -0,018$; $P = 0,9$). Průměrná osmolalita byla naměřena 293,019 mosmol/kg. Závislost osmoality na spermatokritu opět nebyla prokázána ($r = 0,27$; $P = 0,06$). Hodnota spermatokritu 71,5 % (opět se jedná o průměrnou hodnotu) nám při následném statistickém vyhodnocení nevykazovala žádnou souvislost mezi ostatním měřením (viz. regresní koeficienty a hodnoty P uvedené výše). Průměrné % ž/m spermií bylo v roce 2004 94,5967 a v roce 2005 89,741. Průměr za obě období činí 91,683.

Z výsledků bylo zjištěno, že na základě odběru spermatu okouna říčního a jeho prvotního rozboru ve vztahu k jedinci nelze předpokládat žádnou souvislost mezi hmotností, objemem spermatu, koncentrací spermií a poměrem živých a mrtvých spermií. Naopak by stála za zvážení další studie, ve které by se kladl důraz na vztahy mezi stářím ryb a % živých spermií, popř. vliv způsobu chovu na rychlost dosažení pohlavní dospělosti. Z námi získaných rozborů je nasnadě, že existuje úzká spojitost mezi výše uvedenými charakteristikami. Bude – li se někdo dále zabývat studiem řízené reprodukce okouna a charakteristikami spermatu pro jeho uchování kryogenickou metodou, věřím, že tato práce poskytuje dostatek základních informací pro úspěšné zvládnutí základních znalostí o spermatu tohoto vysoce zajímavého a perspektivního druhu.

8. SEZNAM LITERATURY

Alavi, S. M. H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G., 2007: Fish Spermatology, Alpha Science International Ltd., Oxford, 465s

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart, O., Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility, *Theriogenology*, [online]. 2007 [03 – 04 – 2008], s.276-283,ISSN:0093-691X, :
<http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=Q28kGj2KbBjnbl@M5JP&page=1&doc=2>, ISSN: 0093-691X,

Baruš, V., & Oliva, O., 1995: *Mihulovci a ryby (1)*. Academia., Praha, p.

Baruš, V., & Oliva, O., 1995: *Mihulovci a ryby (2)*. Academia., Praha, 364 – 380 p.

Dyk, V., 1946: *Naše ryby*. Nakladatelství R. Prombergra., Olomouc, 126 – 127 p

Egert, J., Hartman, P., & Štědranský, E., 1984: *Rybářství*. Státní zemědělské nakladatelství., Praha, 14 – 284 p.

Flajšhans, M., & Goendoer, R., 1989: Umelý vytěr okouna říčního (*Perca fluviatilis*). *Buletin VÚRH Vodňany.*, 1989, 3: 10-13.

Flajshans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., The application of image citometry to viability assesment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa, *Cell biology international*, [online].2004,[02-04-2008],s.955-959,
<http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=W13MIflalb8NG14g2dP&page=1&doc=1> ISSN 1065-6995

Hartman, P., Příkryl, I., & Štědranský, E., 1988: *Hydrobiologie*. Státní zemědělské nakladatelství., Praha, 161 – 241 p.

Hillermann, J., 2002: Možnosti intenzivního chovu plůdku okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.), disertační práce, 3 - 140 p.

Gillet, C., Dubois, J.P., Bonnet, S. 1995. Influence of temperature and size of females on timing of spawning of perch, *Perca fluviatilis* in lake Geneva from 1984 to 1993. *Env. Biol. Fishes*, 42:355-363 p.

Klinkhardt, M.B., Buuk, B. Karyological studies in several species of fresh – water fish from brackish coastal waters of south western Baltic .4. The Perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus 1758) *Zoologischer anzeiger* [online].1991, 1 - 2. [2008-04-02]. s.38-43. Dostupné z <http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=Z1a5lih6@pK13EhNLHA&page=1&doc=9>. ISSN 0044-5231.

Kouřil, J., Hamáčková, J. 1999. Artificial propagation of European perch (*Perca fluviatilis* L.) by means of a GnRH analogue. *Cz. J. Anim. Sci.*, 44:309-316.

Kouřil, J., Hamáčková, J., 2000. The semiartificial and artificial hormonally induced propagation of European perch (*Perca fluviatilis*). In: (Eds. Floss, R, Creswell, L.) *Proc. Aqua 2000. Responsible aquaculture in the new millenium* (May 2-6, 2000, Nice, France), Spec. Publ. No. 28, *Europ.Aquacult. Soc.*, Oostende (Belgium), s. 345.

Kouřil, J., Hamáčková, J., Lepič, P., Mareš, J. 2001: Poloumělý a umělý výtěr okouna říčního. *Edice metodik, VÚRH JU Vodňany*, č. 68, 9 s.

Kouřil, J., Hamáčková, J., Lepičová, A., Lepič, P., Mareš, J., Barth, T., 2001: Semiartificial and artificial propagation of European perch (*Perca fluviatilis*) with hormonal stimulation of GnRH α . *Ve: (Ed. Pípalová, I.) Pond Aquaculture in Central and Eastern Europe in the 21st Centure* (May 2-4, 2001, Vodňany, Czech republic), s. 22.

Kouřil, J., Linhart, O. 1997. Temperature effect on hormonally induced spawning in perch (*Perca fluviatilis*). *Pol. Arch. Hydrobiol. (Fish Reproduction '96)*, 44, 1-2:197-202.

Kouřil, J., Linhart, O., Hamáčková, J. 1998: Optimalizace dávek analogu GnRH a teploty vody při hormonálně indukovaném poloumělém a umělém výtěru okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.). Bull. VÚRH Vodňany, 34(4):137-149.

Kouřil, J., Linhart, O., Hamáčková, J.: Optimalizace dávek analogu GnRH a teploty vody při hormonálně indukovaném poloumělém a umělém výtěru okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.). Bull. VÚRH Vodňany, 1998, 34, 4:137-149.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamczarz, A., Skrzypczak, A., Wyszomirska, E. 1996. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquaculture Research, 27(11): 847-852.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R., Fine-structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch, Journal of fish biology [online].1995[03-03-2008],s.492-508,

http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=R1ihbDp1AmdlPbkO34M&page=1&doc=1, ISSN : 0022-1112

Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., Fish sperm composition and biochemistry, Bulletin of the Institut of Zoology, Academia Sinica, Monograph 16. 288 – 311 1991

Lusk, S., Baruš, V., Vostradovský, J., 1983: Ryby v našich vodách. Academia, Praha, 174 – 175 p.

Migaud H., Fontaine P., Sulistyó I., Kestemont P, Gardeur J.N., 2002. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) : effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. Aquaculture 205: 253 – 267.

Musil, J., & Adámek, Z., 2003: Prefační tlak okouna říčního (*Perca fluviatilis*) na střevličku východní (*Pseudorasbora parva*) v modelových rybníčních podmínkách. Buletin VÚRH Vodňany., 2003 (1/2): 75 – 80.

Noveiri, S.B., Alipour, A., Pourkazemi, M., Sperm morphometry, density spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), Journal of applied ichthyology [online]. 2006 [03-04-2008],s.380-383,

<http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=11&SID=R1ihbDp1AmdlPbkO34M&page=1&doc=2> , ISSN: 0175-8659

Pivnička, K., 1981: Ekologie ryb. Státní pedagogické nakladatelství., Praha, 28 – 202 p.

Pospíšil, O., 2000: Atlas našich ryb. Ottovo nakladatelství s. r. o., Praha, 138 – 139 p.

Skrypczak, A., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Kujawa, R. 1998 Biotechnology of reproduction and breeding of perch (*Perca fluviatilis* L.) under controlled conditions. Sb. abstr. XVIII. Genetické dny, České Budějovice, s. 56

Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik VÚRH JU č. 22: 36s.

Szcerbowski, A., Kucharczyk, D., Luczynski, M.J. 1998. Preliminary observations on artificial spawning of European perch (*Perca fluviatilis* L.) Sb. abstr. XVIII. Genetické dny, České Budějovice, s. 57.

Šimek, Z., 1954: Rybářství na tekoucích vodách. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 43 – 46 p.

Švátora, M., 1986: Okoun říční. Naše vojsko., Praha, 6 – 59 p.

Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J., The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, AQUACULTURE [online]. 2001, 1 - 2 [03-04-2008], s. 191-200
http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=8&SID=Q28kGj2KbBjnbl@M5JP&page=2&doc=20 , ISSN: 0044-8486

WIRTZ, S., STEINMANN, P., (2006) Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L.
Journal of Fish Biology 68 (6) , 1896–1902 doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01065.x