Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Hodnocení oplozenosti a vývoje embryí divoce zbarvených a albinotických forem jesetera

M. Pšenička, T. Saito, M. Rodina

Edice Metodik 153

Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Hodnocení oplozenosti a vývoje embryí divoce zbarvených a albinotických forem jesetera

M. Pšenička, T. Saito, M. Rodina

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu OP Rybářství 2007–2013:

Metodiky IV (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00479

EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektů:

Výsledky byly získány za finanční podpory projektů MŠMT CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 34 %,
CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 33 %
a Posílení excelence vědeckých týmů na FROV JU (CZ.1.07/2.3.00/20.0024) – 33 %

č. 153

Vodňany

ISBN 978-80-7514-018-0

OBSAH

1. CÍL METODIKY 6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY 6
2.1. ÚVOD 6
2.2. PŘÍPRAVA JESETERŮ K VÝTĚRU 6
2.3. OBECNÝ POPIS JIKRY JESETERA 7
2.4. OPLOZENÍ A ODLEPKOVÁNÍ JIKER 9
2.5. VÝVOJ EMBRYA 9
2.5.1. Rýhování 9
2.5.2. Abnormální vývoj embrya 10
2.5.3. Blastulace 11
2.5.4. Gastrulace 12
2.5.5. Neurulace 13
2.5.6. Stadium před líhnutím 14
2.5.7. Líhnutí 14
2.6. HODNOCENÍ KVALITY JIKER 15
2.6.1. Makroskopické hodnocení kvality jiker 15
2.6.1. Mikroskopické hodnocení kvality jiker 17
2.7. HODNOCENÍ OPLOZENOSTI JIKER A VÝVOJE EMBRYÍ 18
2.8. HODNOCENÍ VÝVOJE EMBRYÍ ALBINOTICKÉ FORMY JESETERA 19
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 21
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 22
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY 22
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 23
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 24

1. CÍL METODIKY

Hodnocení oplozenosti a vývoje embryí je důležitým nástrojem umožňujícím další management embryí. „Líhňař“ se může například rozhodnout, jakou skupinu embryí upřednostnit nebo v případě nevyvíjejících se embryí vyřadit. Předběžně lze takto také odhadnout množství získaného plůdku. Cílem metodiky je popsání postupu hodnocení kvality jiker před oplozením a přehled o vývoji a způsobu určování vývoje embryí jesetera divokého a albinotického zbarvení. Obecně jsou albinotické jikry a embrya jesetera bílé bez jakéhokoliv kontrastu. Určování oplozenosti a vývoje je bez barvení prakticky nemožné. Tato metodika nabízí postup hodnocení albinotických embryí pomocí dostupných a v praxi použitelných kontrastních a barvících technik. Nevyvíjející se jikry jsou intenzivně zbarveny a lze tak velice jednoduše určit jejich oplozenost. Navíc použité barvení zvyšuje kontrast dělicí rýhy a lze tak sledovat vývoj již ve fázi rýhování.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

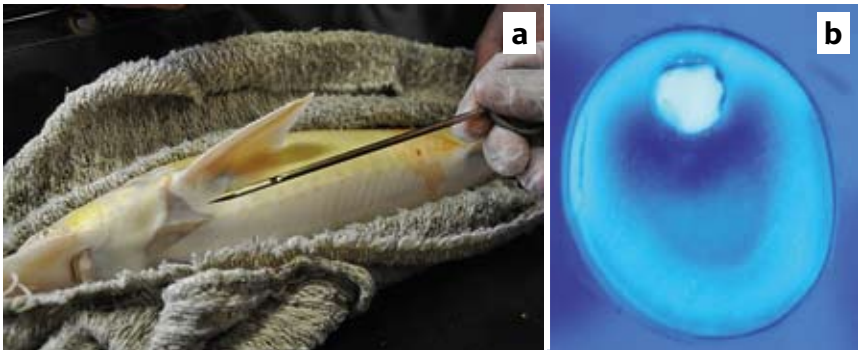
2.1. Úvod

Jeseteři jsou velice významné druhy ryb. Předpokládá se, že se tyto ryby vyvinuly před 200 miliony lety a žijí na Zemi od dob dinosaurů v téměř stejné podobě, jako je známe dnes (Bemis a kol., 1997). Bohužel dnes jsou jeseteři podle Červené knihy ohrožených druhů nejvíce ohroženou skupinou druhů na světě (IUCN, 2010). To je zapříčiněno především drancováním jeseterů pro kaviár. Chov jeseterů a produkce kaviáru v akvakultuře je tedy považováno nejen za perspektivní oblast, ale také za způsob ochrany jeseterů. Celosvětová produkce jeseterů vzrostla v posledních letech z 2 500 tun v roce 1999 na 25 600 tun v roce 2008 (FAO, 2008). U výroby kaviáru lze sledovat podobný trend. Ta vzrostla z 1,7 tun v roce 2003 na 27,3 tun v roce 2007 (Wuertz a kol., 2009). Navíc vysoká cena kaviáru zaručuje rentabilitu chovů jeseterů v akvakultuře. Přičemž kaviár z albinotické formy jesetera patří k nejdražším na světě. Kilogram tohoto vysoce kvalitního „zlatého kaviáru“ může stát podle Guinnessovy knihy rekordů až 25 000 $ (Guinness world records, 2014).

2.2. Příprava jeseterů k výtěru

Vzhledem k pozdnímu dospívání a nepatrnému pohlavnímu dimorfizmu u jeseterů je nutné provádět biopsii k určení pohlaví a zralosti oocytů (obr. 1a). Oocyty odebrané trokarem jsou fixovány po dobu 24 h v Sérrově roztoku (složení na 100 ml: 60 ml etanolu 96%, 30 ml formaldehydu 38%, 10 ml ledové kyseliny

octové 99%). Poté se opláchnou pitnou vodou a rozříznou v podélné rovině žiletkou. Hodnocení polohy jádra se provádí pod stereomikroskopem. Detailně je metoda odběru oocytů a hodnocení polohy jádra popsána v práci Kazanski a kol. (1978), Rodina (2006) a Gela a kol. (2008). Již v této fázi přípravy k výtěru je nutné modifikovat metodiku pro albinotickou formu jesetera. Rozpůlené jikry je nutné nabarvit 0,01% vodným roztokem methylenové modři po dobu 10 minut a znovu opláchnout vodou. Poté je možné odečítat polohu jádra podobně jako u jiker od divokých forem jesetera (obr. 1b).



Obr. 1. *Biopsie oocytů jesetera malého (Acipenser ruthenus) albinotické formy (a) (foto M. Pšenička) a barvený oocyt pro určení polohy jádra (b) (foto M. Rodina).*

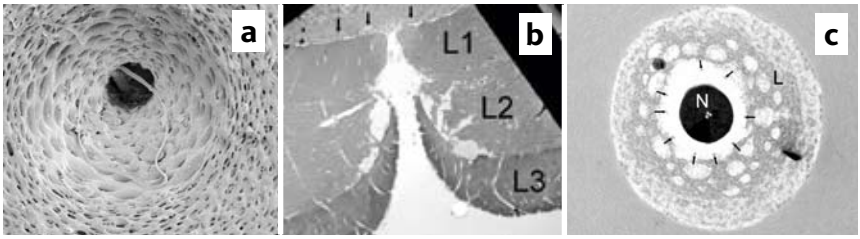
Ryby připravené k výtěru jsou umístěny do bazénů, kde jsou postupně adaptovány na teplotu 14–15 °C. Pět až sedm dní po ustálení teploty jsou samci ošetřeni jednorázovou vnitrosvalovou injekcí suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku v dávce 4 $mg.kg^{-1}$ živé hmotnosti ryby. Optimální spermiace nastává přibližně po 36 hodinách od injikace. Sperma se odebírá kanylou zavedenou do chámovodu a poté se uchovává na ledu. Samice se stimulují vnitrosvalovou injekcí suspenze kapří hypofýzy ve dvou dávkách. První dávka je 0,5 $mg.kg^{-1}$ živé hmotnosti a po 12 hodinách následuje druhá dávka 4,5 $mg.kg^{-1}$. Ovulace jiker nastává přibližně po 42 hodinách od první dávky, kdy na dně bazénu můžeme pozorovat ovulované jikry nebo jsou případně jikry uvolňovány po mírném zatlačení na dutinu břišní. Umělá reprodukce jeseterů je detailně popsána v metodice Gela a kol. (2008).

2.3. Obecný popis jikry jesetera

Ovulovaná jikra se v závislosti na druhu liší velikostí a tvarem, např. jeseter ruský (*A. gueldenstaedtii*) má jikru kulatého tvaru. Spíše vejčitý tvar má pak

jikra např. jesetera malého (*A. ruthenus*), jesetera sibiřského (*A. baerii*), či vyzy velké (*Huso huso*). Velikost jiker jednotlivých druhů je uvedena v tab. 1. Většina druhů jeseterů divokého zbarvení má jikry s výjimkou animálního pólu zbarvené do břidlicovitě šedé barvy, zatím co jikry jesetera ruského mají přirozeně slabě cihlovou barvu. Animální pól jiker jeseterů je většinou světlejší, ohraničený 2 až 3 tmavými kruhy. Bílé skvrny na animálním pólu obvykle značí přezrálé jikry. Jikry albinotických forem jeseterů jsou bílé až světle žluté barvy. Variace jsou často odrazem v odlišnostech zralosti a stavu jiker (Dettlaff a kol., 1993).

Obal jikry jesetera se skládá z alveolární vrstvy (L3), *zona radiata externa* (L2), *zona radiata interna* (L1) a vrstvy kortikálních granulí. Obal jikry je opatřen výhradně na animálním pólu několika mikropylárními otvory sloužícími k průniku spermie. Přesto mají jeseteři, na rozdíl od většiny ryb, spermie vybavené akrozomem, přičemž akrozom zde má funkci pravděpodobně pouze k ukotvení spermie v mikropylárním otvoru (Pšenička a kol., 2010) (obr. 2a, b, c).



Obr. 2. *Snímky mikropylárního otvoru jesetera sibiřského (Acipenser baerii) z elektronového mikroskopu. Snímek a) průnik spermie mikropylárním otvorem, b) podélný řez mikropylárním otvorem, kde L1, L2 a L3 jsou obaly vajíčka a šipky ukazují kortikální alveoly a c) příčný řez mikropylárním otvorem, kde L je obal vajíčka, šipky ukazují na posterolaterální výběžky akrozomu ukotvující spermii ve vajíčku a N jádro spermie (Pšenička a kol., 2010).*

Tab. 1. *Velikost neaktivovaných jiker jeseterovitých ryb (převzato z Dettlaff a kol., 1993).*

Druh	Průměr (mm)	Druh	Průměr (mm)
Huso huso	3,6–4,0	*A. stellatus*	2,7–3,2
H. dauricus	3,6–4,0	*A. sturio*	2,6–3,0
Acipenser transmontanus	3,5–4,0	*A. baerii*	2,5–2,7
A. gueldenstaedtii colchicus	3,2–3,8	*A. oxyrhynchus*	2,5
A. gueldenstaedtii	3,0–3,5	*A. ruthenus*	1,9–2,0
A. brevirostrum	3		

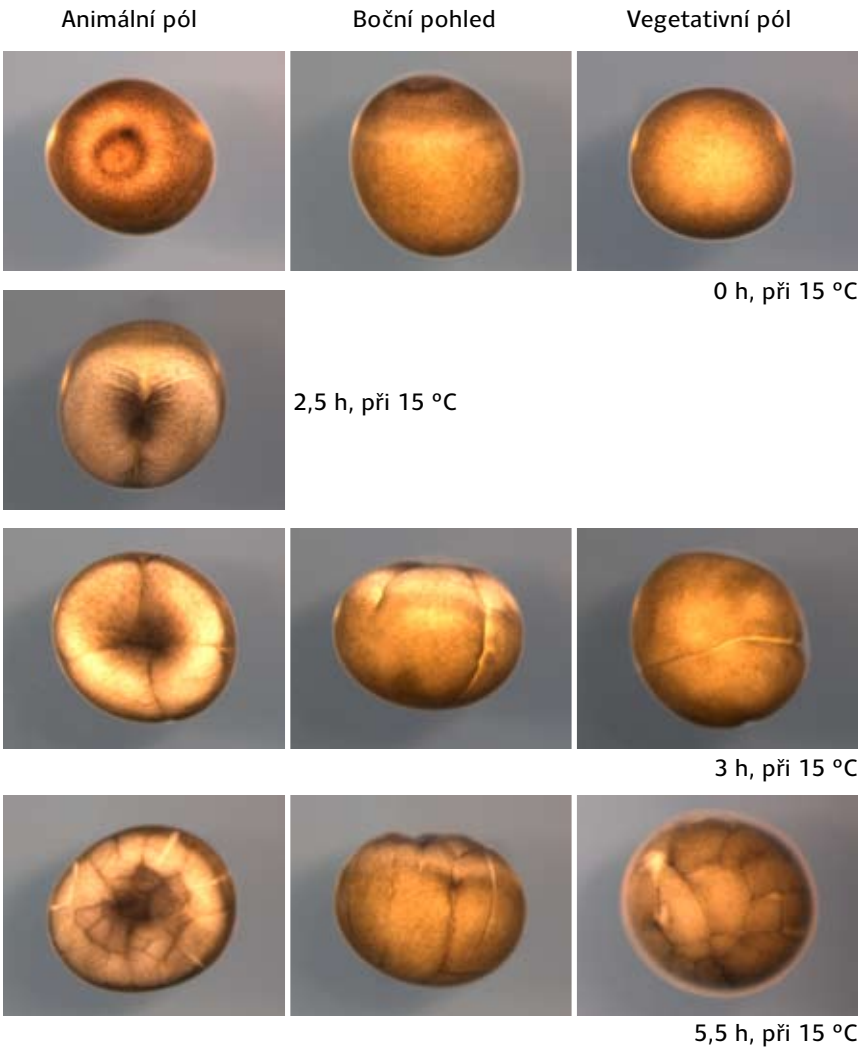
2.4. Oplození a odlepkování jiker

Oplození a odlepkování jiker je detailně popsáno v metodice Gela a kol. (2008). Ve stručnosti, 1 kg jiker je oplozován 20–25 ml heterospermatu od mlíčáků s nejkvalitnějším spermatem rozředěným ve 4 l vody z líhně o teplotě 15 °C. Po oplození vajíčka spermií nastává kortikální reakce, čili uvolnění obsahu kortikálních granulí pod obalem a dalšími mikropylárními otvory jikry. Obsah kortikálních granulí vytváří tzv. perivitelinní prostor, který blokuje průnik dalších spermií. Do 5 min po oplození začínají jikry jesetera lepit. Odlepkování jiker se provádí většinou po dobu 60 min pomocí plnotučného mléka nebo suspenze jílu podobně jak popisuje Gela a kol. (2003) u jiker lína obecného. Případně lze použít v různých kombinacích i 0,04% roztok taninu (kyseliny tříslové). Použití taninu je ovšem závislé na kvalitě vody a koncentraci rozpuštěných kovů ve vodě. Tanin tvoří s těmito kovy komplexy, což má za následek vytvrdnutí obalů jiker a komplikace při kulení plůdku (Takeda a kol., 2002).

2.5. Vývoj embrya

2.5.1. Rýhování

Vývoj embrya začíná oplozením jikry spermií a končí stadiem larvy při přechodu na exogenní výživu. Rané fáze vývoje jsou podobné vývoji bezocasých obojživelníků. Embrya jeseterů podléhají podobně jako bezocasí obojživelníci holoblastickému rýhování. Při holoblastickém rýhování dochází ke vzniku menších stejně velkých blastomer na animálním pólu a na vegetativním pólu dochází k nesymetrickému rýhování, při kterém vznikají větší blastomery. První dělicí rýha se tvoří od animálního a postupuje k vegetativnímu pólu. Druhá rýha se pak formuje kolmo k první rýze. V době, kdy druhá rýha dosáhne ekvatoriální roviny, dochází teprve u první rýhy k propojení na vegetativním pólu. Po druhém rýhování je pak embryo rozdělené na 4 stejné blastomery. Další rýhovaní pak nemusí být vždy zcela pravidelné a velikosti blastomer se mohou do jisté míry lišit. Blastomery na animálním pólu dávají vzniknout veškerým somatickým buňkám, zatímco vegetativní pól se vyvíjí ve žloutkový váček obsahující velké žloutkové granule s lipidovými inkluzemi určenými k výživě embrya. Kromě toho obsahuje vegetativní pól prekurzory zárodečných buněk, budoucích gamet (Saito a kol., 2014). V této fázi vývoje je animální pól lehce pigmentovaný, zatímco vegetativní pól je spíše tmavý (Dettlaff a kol., 1993). Embryo se přirozeně orientuje animálním pólem vzhůru. Stadium rýhování je nejvhodnějším obdobím pro hodnocení oplozenosti jiker (obr. 3).

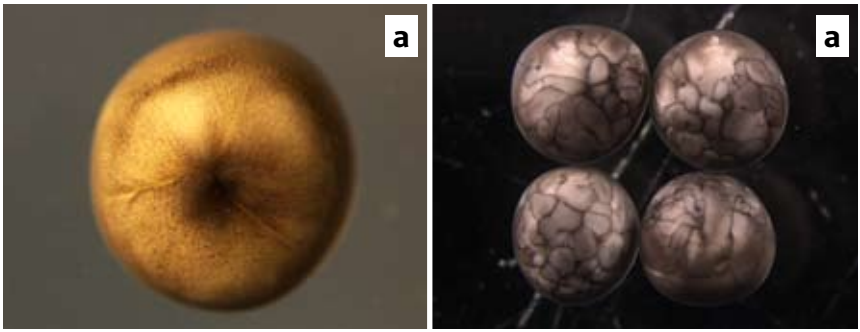


Obr. 3. *Rýhování embryí jesetera malého (Acipenser ruthenus) (foto Z. Linhartová).*

2.5.2. Abnormální vývoj embrya

Nejčastější příčinou abnormálně se rýhujících jiker je polyspermie (tj. proniknutí více spermií do vajíčka) a partenogenetické rýhovaní (rýhování neoplozeného vajíčka). Polyspermie může být způsobena kombinací většího množství mikropylárních otvorů ve vajíčku a použití příliš velkého množství

spermií k oplození. Dále zde hraje roli i kvalita gamet. Polyspermické rýhování se nejčastěji projevuje vznikem tří, ale někdy také 5 až 6 nepravidelných blastomer při první fázi rýhování (obr. 4a). Partenogenetické rýhování se také projevuje nepravidelným rýhováním, ale nepravidelná je v tomto případě i délka rýh. Dělící rýhy se v tomto případě většinou neproříznou ani do vegetativní části jikry (Dettlaff a kol., 1993). Během našich experimentů se většina embryí vykazujících polyspermické rýhování dále vyvíjí s různými vývojovými vadami. Partenogeneticky se rýhující jikry jsou pak neživotaschopné a jejich vývoj se zastavuje ve fázi rýhování okolo 32 buněk (obr. 4b). Z našich zkušeností vyplynulo, že některé samice jsou schopné produkovat až 100 % partenogeneticky se rýhujících jiker, v případě kdy nedojde k oplození. Je tedy důležité tento faktor nepodceňovat. Závěrem tohoto odstavce je třeba dodat, že polyspermie nebyla u jeseterů prozatím vědecky průkazně podložena a jedná se tedy pouze o hypotézu.

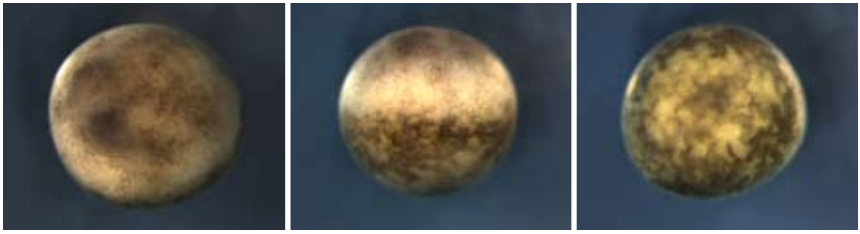


2,5 h, při 15 °C 6 h, při 15 °C

Obr. 4. *Abnormálně se vyvíjející embrya. Polyspermické rýhování u jesetera malého (Acipenser ruthenus) (a) a partenogenetické rýhování (b) u jesetera sibiřského (Acipenser baerii) (foto M. Pšenička).*

2.5.3. Blastulace

V této fázi vývoje jsou jednotlivé blastomery animálního pólu již nerozeznatelné a animální pól se pak jeví hladkým a na povrchu embrya se objevuje pigment (Conte a kol., 1988). V animální části dochází ke vzniku blastocelu (prvotní dutiny) a desynchronizovanému dělení buněk, což vede k distribuci buněk do dvou zárodečných listů: epiblast (prekurzor ektodermu) a hypoblast (prekurzor endodermu a mesodermu). Na konci fáze blastulace vzniká výrazné rozhraní mezi světlým animálním pólem a tmavě pigmentovaným vegetativním pólem, kde jsou stále rozlišitelné blastomery (Dettlaff a kol., 1993) (obr. 5).

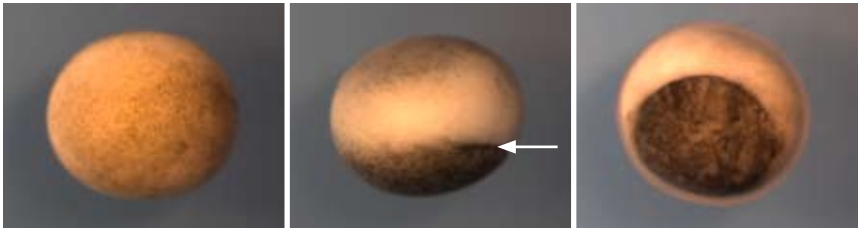


22 h, při 15 °C

Obr. 5. *Embryo jesetera malého (Acipenser ruthenus) ve stadiu blastuly (foto M. Pšenička).*

2.5.4. Gastrulace

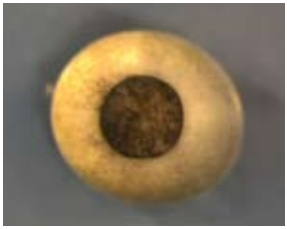
Toto období je charakteristické buněčnými přesuny a vznikem zárodečných vrstev. V ekvatoriální rovině dochází ke vzniku pigmentovaného pásu, následovaného vývojem prvoúst (blastoporu), tzv. srpku (obr. 6). Prostřednictvím blastoporu dochází k involuci, při které se hypoblast invaginuje (vchlipuje) do dutiny blastocelu přes dorzální část blastoporu a tvoří dva zárodečné listy, endoderm a mesoderm. Masa buněk, které nemigrují dovnitř embrya a pokrývají tak jeho povrch, se nazývá epiblast, ze kterého se vyvíjí ektoderm. Blastocel se během involuce zmenšuje, až úplně zaniká a dochází k tvorbě prvostřeva (druhé embryonální dutiny). Během této fáze obrůstají buňky epiblastu (animálního pólu) celou plochu vegetativního pólu embrya (tzv. epibolický pohyb buněk), což se vyznačuje ustupováním tmavého vegetativního pólu a rozšiřováním světlého animálního pólu (Dettlaff a kol., 1993). Při pokrytí 2/3 povrchu embrya světlou částí se blastopor uzavírá a dochází k formování tzv. žloutkového bodu (Conte a kol., 1988) (obr. 7). Epibolický pohyb buněk epiblastu pokračuje přes vegetativní oblast, čímž se žloutkový bod zmenšuje, až úplně zmizí a z původních prvoúst zůstává jen malá štěrbinka. S tím je spojený vznik dorzální osy vyznačující se tenkou rýhou



28 h, při 15 °C

Obr. 6. *Vznik tzv. blastoporu (šipka) u jesetera malého (Acipenser ruthenus) (foto T. Saito).*

s jemně pigmentovanými liniemi (Dettlaff a kol., 1993). V této fázi se mění těžiště embrya. To se orientuje vyvíjející se hřbetní stranou nahoru. V období mezi koncem gastrulace (formování žloutkového bodu) do začátku neurulace je embryo nejcitlivější k otřesům (Conte a kol., 1988).



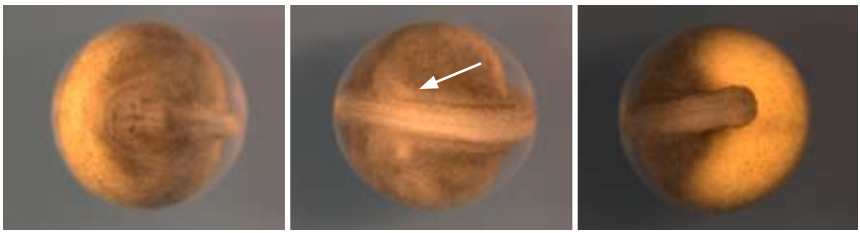
34 h, při 15 °C

Obr. 7. *Embryo jesetera malého (Acipenser ruthenus) ve fázi žloutkového bodu (foto T. Saito).*

2.5.5. Neurulace

Ve fázi rané neurulace se vyvíjí široká neurální ploténka s neurálními valy, které se postupně zvedají dorzálním směrem a později splývají, až vytvoří neurální trubici. Objevují se základy prvoledvin (pronefros), které se během vývoje rozšiřují a posunují k hlavě. Podél trupu jsou vytvářeny somity (mesodermální segmenty). Vyvíjí se hlava a základy očí. Na konci této fáze je již embryo výrazně členité a vytváří základ ocasu (obr. 8) (Dettlaff a kol., 1993).

54 h, při 15 °C



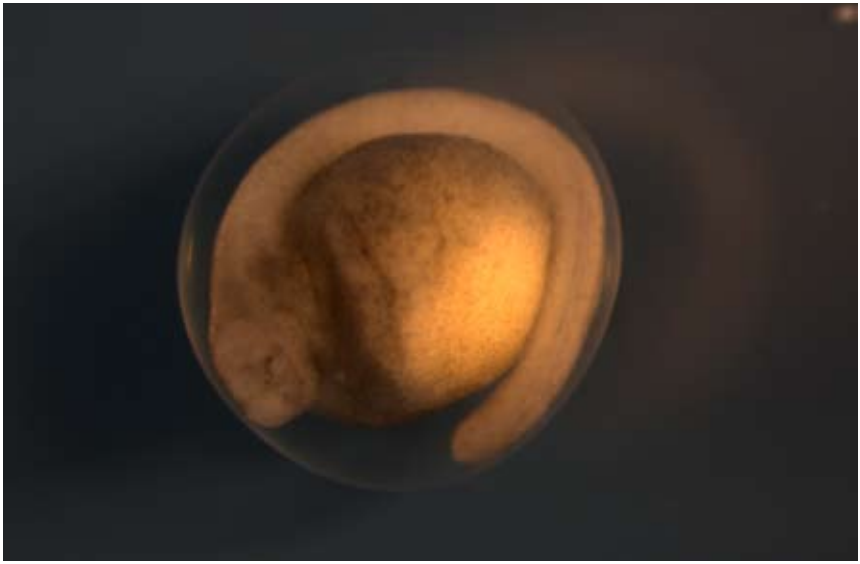
77 h, při 15 °C

Obr. 8. *Embryo jesetera malého (Acipenser ruthenus) ve fázích neurulace (šipka označuje pronefros) (foto Z. Linhartová).*

2.5.6. Stadium před líhnutím

V další fázi vývoje se vytváří srdce a začíná bít. Při mechanickém podráždění již reagují svaly trupu záškubem. Začínají být patrné základy sluchových a čichových orgánů a očí. Podél trupu se vyvíjí ledvinové kanálky ústící do močové papily. Ocas se základem ploutevního lemu se dorzoventrálně zplošťuje (Dettlaff a kol., 1993).

Ocas se ve fázích před líhnutím přibližuje k srdci (obr. 9), až se později dotkne hlavy, ocas a kaudální část trupu se začínají napřimovat (Conte a kol., 1988). Od papily až k okraji žloutkového váčku je patrné pigmentované střevo. Ploutevní lem se rozšiřuje. Sluchové orgány, nosní jamky a oči jsou již jasně viditelné (Dettlaff a kol., 1993).



96 h, při 15 °C

Obr. 9. *Embryo jesetra malého (Acipenser ruthenus) ve fázi před líhnutím (ocas se přibližuje k srdci a trup se začíná napřimovat) (foto Z. Linhartová).*

2.5.7. Líhnutí

K uvolnění plůdku z jikry dochází aktivním pohybem, většinou ocasem napřed. Největší část plůdku se kulí většinou druhý až třetí den od prvního kulení v závislosti na teplotě a způsobu odlepkování. Nakonec se „dokuluje“ méně životný plůdek (Gela a kol., 2012).

Líhnoucí se embryo má 55 až 60 somitů (obr. 10), výrazné oči a nosní jamky, trup se narovnává a konec ocasu se mírně zvedá. Srdce na ventrálním povrchu žloutku čerpá červené krvinky pomocí Cuvierových trubic (Dettlaff a kol., 1993).

Obr. 10. *Larva jesetera malého (Acipenser ruthenus) (foto M. Pšenička).*

2.6. Hodnocení kvality jiker

Kvalitou jiker můžeme rozumět souhrn jejich vlastností, které jsou předpokladem k jejich úspěšnému oplození, vzniku zygoty, životaschopného embrya, larvy, jež začne přijímat vnější potravu. Někdy je též takto definovaná kvalita označována jako biologická kvalita jiker. Vzhledem k tomu, že biologickou hodnotu jiker není možné exaktně určit před oplozením, přicházejí ke slovu metody odhadu kvality na základě přímo pozorovatelných nebo měřitelných vlastností. Metody lze rozdělit na makroskopické a mikroskopické.

2.6.1. Makroskopické hodnocení kvality jiker

Makroskopicky můžeme hodnotit: barvu jiker, velikost jiker, konzistenci, množství jikrné tekutiny, přítomnost přimísenin, případně parazitů. Jikry jeseterovitých jsou obecně tmavé, neprůhledné, od černé barvy po různé odstíny šedé až po zelenošedou s různě zvýrazněným animálním pólem, na kterém je často patrná světlá tečka s prstencem. Barva je druhově specifická, ale i v rámci druhu mohou být rozdíly. Z hlediska praktické použitelnosti je

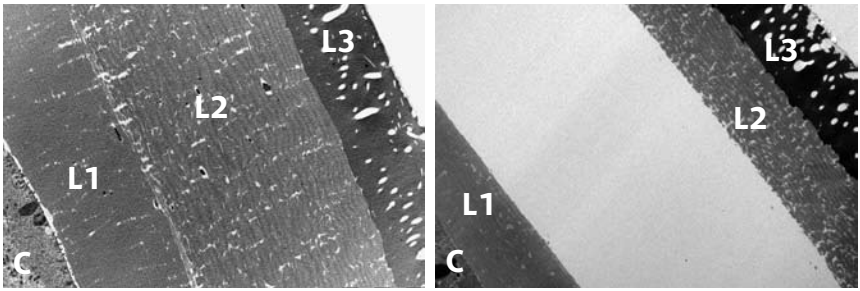
třeba, aby barva jiker byla homogenní, přítomnost jiker lišících se barvou může ukazovat na jikry nestejnoměrně dozrálé, respektive přezrálé jikry, což je poměrně časté v případě resorpce nevytřených jiker v předchozím výtěrovém cyklu. Typickým znakem přezrálých jiker je světlé mramorování. Výjimku v barvě tvoří albinotické či xantorické formy jeseterů, které mají zralou ovulovanou jikru bílou, popř. nažloutlou až žlutou.

Velikost jiker je druhově specifická a příklady jsou uvedeny v tab. 1. V rámci druhu je velikost závislá především na stáří generačních ryb, přičemž starší jikernačky mající za sebou více výtěrových cyklů mají jikru větší. Konzistence vytřených jiker, množství a vzhled jikrné tekutiny jsou dobrým ukazatelem při odhadu kvality jiker a odrážejí především fyziologicky proběhlou ovulaci, dobu od ovulace a techniku výtěru. Jikrná tekutina je vazká hlenovitá bezbarvá tekutina, která tvoří 5–10 % hmotnosti vytřených jiker a jde částečně z vytřených jiker slít. Jikry jsou lepivé, ale lze je ve vodě rozmíchat a lepit znovu začínají přibližně za 5 min po aktivaci. Jednotlivé jikry mají být soudkovitého tvaru, pružné, za sucha se jednotlivé jikry obtížně oddělují od sebe. Větší množství jikrné tekutiny spolu s její vodnatou konzistencí často ukazuje na přezrálé jikry, tedy jikry již delší dobu ovulované. V tomto případě jsou jikry lehce oddělitelné od sebe, s postupujícím časem od ovulace jikra měkne, není pružná, nedrží tvar a má tendenci se slepit. Naopak „suchá“ jikra vytřená téměř bez jikrné tekutiny může být vytřená brzy, silou, velmi často je možné v takových jikrách nalézt útržky gonád s neovulovanou jikrou, popř. vazivový základ ovaria i s oocyty ve 2. stadiu. Velké i malé množství jikrné tekutiny může být ukazatelem snížené schopnosti oplození vytřených jiker. Šedá barva jikrné tekutiny ukazuje na přítomnost tukových kapének, které mohou pocházet buď z rozpadlých či při výtěru rozmačkaných jiker, nebo z nevstřebané tukové tkáně gonád. Narůžovělá barva navíc indikuje přítomnost krve. V obou případech jde o nechtěný a nefyziologický stav a lze očekávat zhoršenou kvalitu jiker. Přítomnost přimísenin v jikrách ukazuje spíše na způsob a zvládnutí výtěru, přesto mohou sekundárně ovlivnit schopnost oplození jiker. Přimíseninami mohou být výkaly, krev, voda, sliz, případně někteří endoparazité žijící v tělní dutině jeseterů. Krev nepředstavuje pro kvalitu jiker nebezpečí a ukazuje jen na nefyziologický stav – poranění vývodných cest, gonád nebo jiných orgánů tělní dutiny. Voda a sliz mohou způsobit aktivaci jiker a tím jejich znehodnocení nebo snížení schopnosti oplození, ačkoliv jikry jeseterovitých jsou schopné oplození po dobu několika minut od aktivace vodou (Pšenička a kol., 2010). Výkaly mohou provokovat lepivost.

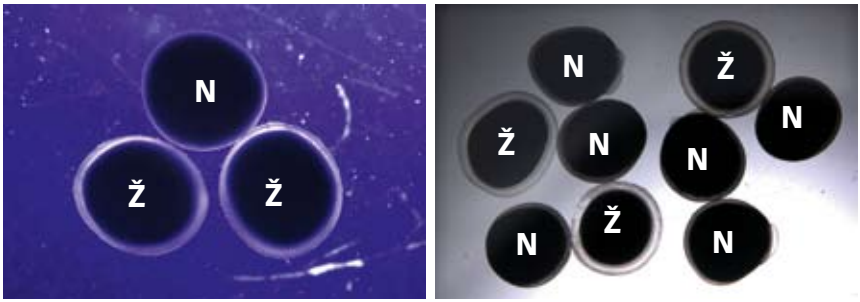
Přítomnost parazitů, jako je např. jeseterovka listová *Amphilina foliace*a ve vytřených jikrách je v rámci akvakulturních chovů poměrně vzácná a obvykle nepůsobí problémy.

2.6.2. Mikroskopické hodnocení kvality jiker

Patnáct minut po aktivaci vodou se alveolární vrstva (L3) a *zona radiata externa* (L2) začíná oddělovat od *zona radiata interna* (L1) (obr. 11). Tento proces lze jednoduše sledovat pod běžným stereomikroskopem se spodním osvětlením a probíhá pouze u jiker schopných oplození (obr. 12). Můžeme ho tedy využít k prvnímu objektivnímu hodnocení kvality jiker. Jikry, u kterých nedochází po aktivaci vodou k oddělení vrstev, nejsou schopné oplození a vývoje. Využití tohoto procesu není ovšem vhodné pro hodnocení oplozenosti, jelikož se jikrné obaly podobně oddělují i u neoplozených jiker. Toto hodnocení je možné provádět jak pro albinotické tak pro divoce zbarvené jikry. Tohoto prostoru mezi vrstvami lze využít např. i pro mechanické oddělení vrstev L3 a L2 od jikry (pomocí pinzet) pro snazší hodnocení vývoje či mikromanipulační techniky.



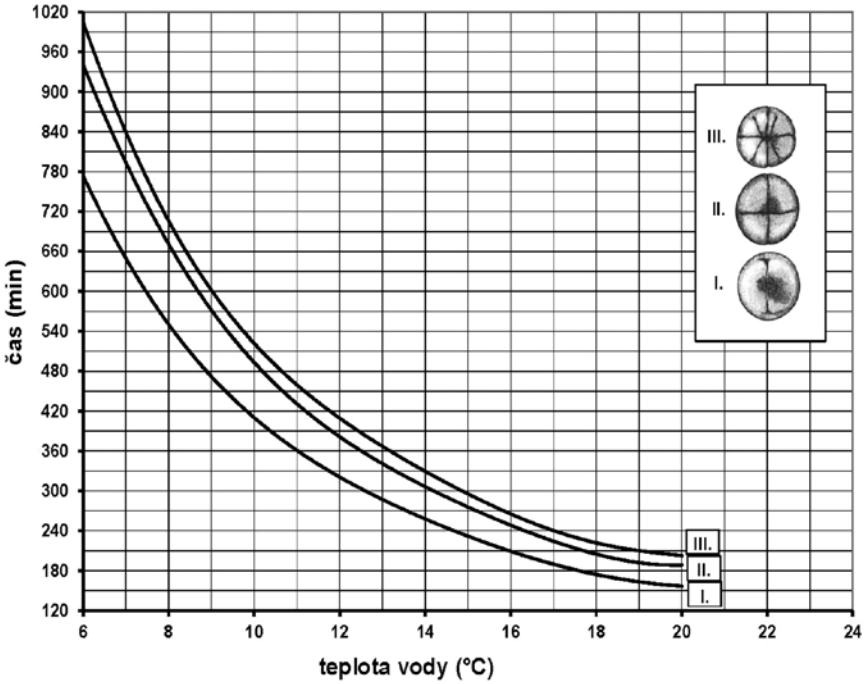
Obr. 11. *Fotografie obalů jikry jesetera sibiřského (Acipenser baerii) pořízené transmisním elektronovým mikroskopem před aktivací vodou (vlevo) a 30 min po aktivaci vodou (vpravo), kde dochází k oddělování zevních obalů (L3 a L2) od vnitřního obalu (L1) přiléhajícího k cytoplasmě vajíčka (C) (foto M. Pšenička).*



Obr. 12. *Hodnocení kvality jiker jesetera malého (Acipenser ruthenus) pomocí spodního světla stereomikroskopu po 30 min od aktivace vodou. Fotografie vlevo ukazuje albinotické jikry a snímek vpravo jikry divokého zabarvení (foto M. Pšenička).*

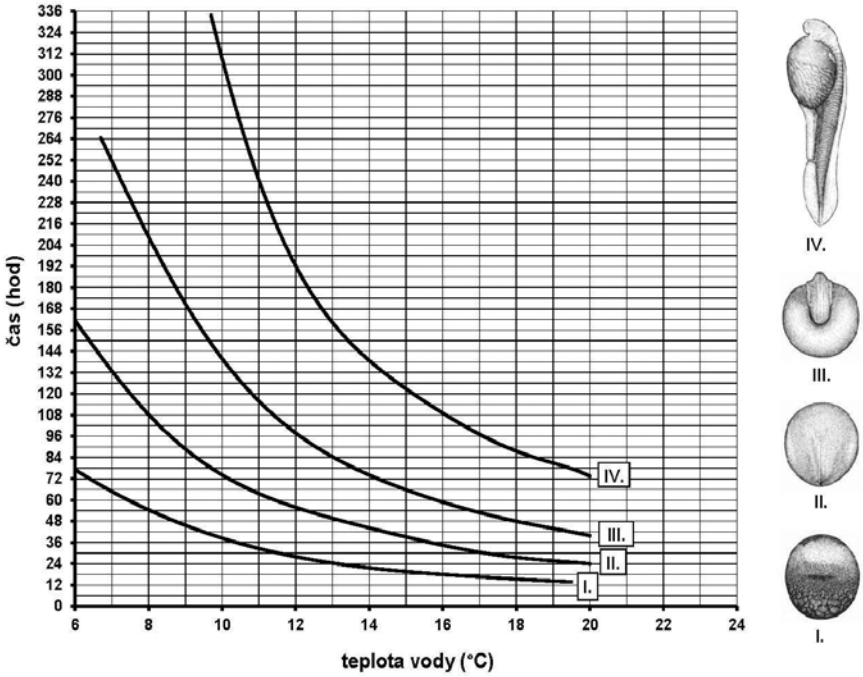
2.7. Hodnocení oplozenosti jiker a vývoje embryí

Fáze rýhování je ideální pro první hodnocení oplozenosti jiker (jeseter malý 4–6 hodin při 15 °C). Správné načasování hodnocení oplozenosti jiker udává graf 1. K hodnocení oplozenosti se posuzuje 50 až 100 embryí z jednoho inkubačního přístroje. V případě jiker jesetera s divokým typem zabarvení postačí k vyhodnocení běžný stereomikroskop s horním zdrojem světla. Je ovšem třeba rozlišovat normální vývoj od abnormálního (polyspermie, partenogeneze).



Graf 1. *Závislost začátku fáze rýhování na teplotě vody u jesetera malého (Převzato z Dettlaff a kol., 1993 a Gela a kol., 2012).*

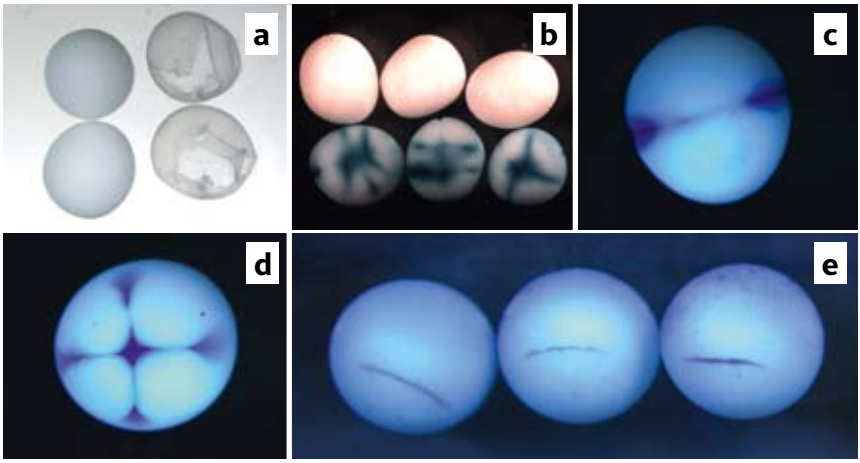
Od fáze blastuly je vizuální hodnocení vývoje embryí náročnější. S jistotou můžeme potvrdit vývoj embrya až podle žloutkového bodu. Ten se ovšem nachází na vegetativním pólu a je proto nutné embrya obracet. Navíc, jak již bylo řečeno, v období formování žloutkového bodu embryo přechází do stadia nejcitlivějšího k otřesům a tedy i manipulaci. Od fáze neurulace je pak vývoj embrya dobře patrný i na animálním pólu a embryo opět přichází do stadia méně citlivého k otřesům.



Graf 2. *Vývoj embrya jesetera malého (Acipenser ruthenus) při různých teplotách. Křivka I – počátek gastrulace, křivka II – konec gastrulace, křivka III – vznik neurální trubice, křivka IV – počátek kulení. (Převzato z Dettlaff a kol., 1993 a Gela a kol., 2012).*

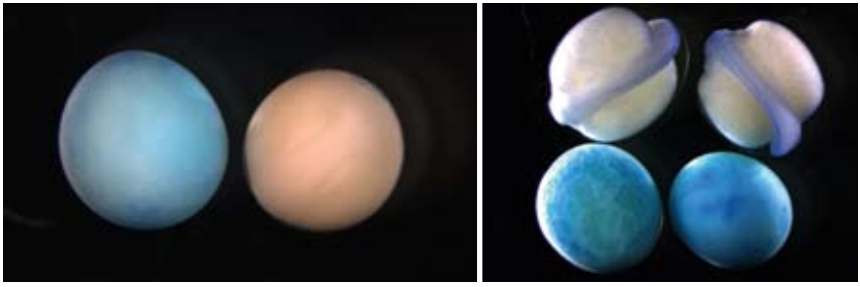
2.8. Hodnocení vývoje embryí albinotické formy jesetera

V případě inkubace embryí albinotické formy jesetera je ve většině případů, kde není dělící rýha dostatečně kontrastní, nutné použít barvení. Během našich experimentů byla použita řada barviv jako např. methylenová modř, trypanová modř, neutrální červeň a akridinová žluť. Zvýšení kontrastu dělící rýhy lze docílit po 30 min barvení 0,01% roztokem všech zmíněných barviv, v případě že embryo před barvením tzv. "dechorionujeme", respektive odstraníme dvě zevnější vrstvy (L3 a L2) pomocí pinzet. Tímto postupem zajistíme nejrychlejší a nejvhodnější podmínky pro hodnocení celého vývoje embrya, již od stadia rýhování (obr. 13). Postup je ovšem vzhledem k nutnosti dechorionace relativně náročný.



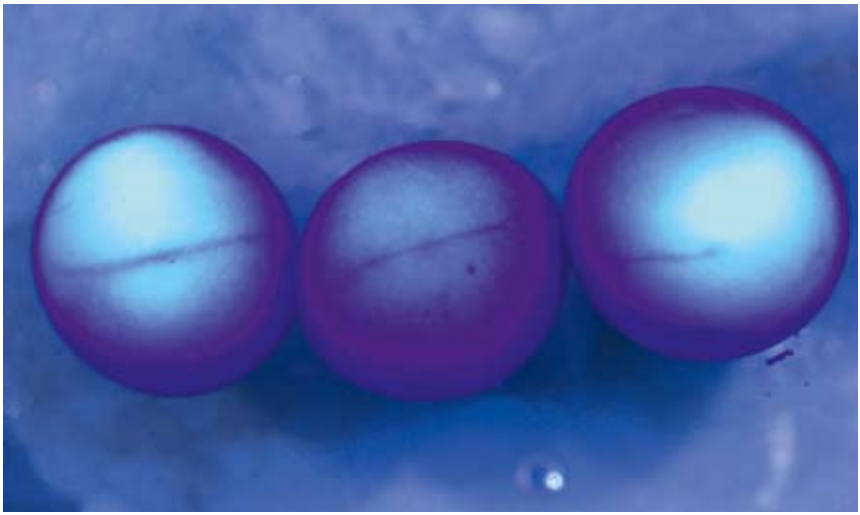
Obr. 13. *Dechorionovaná a obarvená embrya jesetera malého (Acipenser ruthenus) albinotické formy ve stadiu rýhování po dechorionaci. První fotografie (a) ukazuje dechorionaci embryí. Na druhé fotografii (b) jsou rozdíly v kontrastu dělící rýhy před a po obarvení metylenovou modří, další fotografie (c, d, e) pak ukazují fáze rýhování a 4 buněk a vznik blastoporu (foto M. Pšenička).*

V době kdy jsou embrya na začátku fáze gastruly, začínají neoplozená, polyspermatická a partenogenetická embrya většinou hynout. Od tohoto stadia lze pozorovat první zjevné rozdíly v intenzitě zabarvení, přičemž vyvíjející se embrya methylenou modř odbourávají a jsou tak světlejší než uhynulá embrya. Během dalšího vývoje jsou pak rozdíly mezi vyvíjejícími se a uhynulými embryi výraznější a lze je hodnotit pouhým okem (obr. 14).



Obr. 14. *Dechorionovaná a obarvená embrya jesetera malého (Acipenser ruthenus) albinotické formy ve stadiu rané neurulace (vlevo) a pozdní neurulace (vpravo). Fotografie ukazují více zbarvená uhynulá embrya a méně zbarvená vyvíjející se embrya (foto M. Pšenička).*

Alternativou postupu je barvení jiker bez nutnosti dechorionace. Část jiker, určená pro hodnocení procenta oplození a vývoje, je po oplození a odlepkování inkubována s 0,001% roztokem methylenové modři (relativně slabá koncentrace barviva), nejlépe na Petriho miskách ve stejné vodě a při stejné teplotě jako ostatní jikry. Na konci rýhování jsou všechna embrya slabě zbarvena do modra, neboť jikrné obaly absorbují velké množství barviva. Proto je třeba koncentraci barviva připravovat přesně, aby nedošlo k přebarvení obalů embrya. První zjevná známka vývoje obarvených albinotických embryí bez nutnosti dechorionace je tvorba blastoporu (obr. 15).



Obr. 15. *Obarvená embrya jesetera malého (Acipenser ruthenus) albinotické formy ve stadiu vzniku blastoporu (foto M. Pšenička)*

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metoda umělé reprodukce jeseterů je popsána v metodice Gela a kol. (2008) a vývoj embryí jesetera je detailně popsán pomocí nákresů v knize Dettlaff a kol. (1993) a částečně v metodice Gela a kol. (2012). Ovšem sledování vývoje, jakož i určení oplozenosti jiker albinotické formy jesetera doposud nebylo možné. Tato metodika popisuje vývoj a ukazuje reálné fotografie vývoje embryí jesetera, podle kterých může chovatel jeseterů posoudit kvalitu embryí. Dále nově popisuje proces oddělování jikrných obalů těsně po aktivaci jiker vodou, kterým lze hodnotit kvalitu, potažmo schopnost oplození jiker. Pomocí barvení popsaného v této metodice lze navíc hodnotit vývoj albinotických jiker.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CER TIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro chovatele jeseterů. Ti mohou pomocí této metodiky hodnotit kvalitu jiker a vývoj embryí jeseterů divoké i albinotické formy. Hodnocení kvality jiker ještě před samotným oplozením může pomoci chovateli při výběru jiker v případě malého množství kvalitního spermatu. Procento oplozených normálně se vyvíjejících embryí umožňuje další management embryí při inkubaci. Líhňař se může takto rozhodnout jakou skupinu jiker či embryí upřednostnit nebo vyřadit. Předběžně lze takto odhadnout množství získaného plůdku.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupu

V případě pozorování jiker a embryí pouze horním světlem postačí stereomikroskop v hodnotě cca 20–30 tis. Kč. Pro hodnocení kvality jiker je zapotřebí stereomikroskop také se spodním osvětlením (cca 40 tis. Kč). Hodnocení embryí jesetera albinotické formy lze provádět až po barvení methylenovou modří (100 g za cca 1 500 Kč), což stačí na cca 1 000 l koncentrovanějšího barvicího roztoku. Pro rychlou metodu určení vývoje albinotických jiker jsou potřeba dvě jemné pinzety k odstranění prvních dvou povrchových obalů jikry (cca 500 Kč).

Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomický přínos záleží na objemu produkce a kapacitě chovatele jeseterů. V případě že bude mít chovatel obsazené všechny inkubační přístroje a bude se muset rozhodnout, jaká embrya upřednostnit k inkubaci, může správným rozhodnutím ušetřit/vydělat desítky až stovky tisíc Kč. Podle metodiky Gela a kol. (2008) můžeme očekávat hmotnost jiker na úrovni 10–15 % hmotnosti vytírané ryby. Např. u jesetera malého, nejmenšího druhu jesetera, to může být cca 150 g (10 % z 1,5 kg ryby), což je cca 18 000 jiker (v 1 g 110–120 jiker). V případě oplozené albinotické jikry se může cena pohybovat okolo 5 Kč za kus, což dělá 90 tis. Kč za jikry od jedné ryby inkubované na jednom inkubačním přístroji. Z těchto výpočtů je pak evidentní, že správný management s jikrami a embryi je ekonomicky velmi důležitý.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Bemis, W.E., Findeis, E.K., Grande, L., 1997. An overview of Acipenseriformes. Environmental Biology of Fishes 48: 25–71.

Conte, F.S., Droshov, S.T., Lutes, P.B., Strange, D., Strange, E.M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon. Div. Of Agricul. and Natural Resources University of California, USA. 1–103.

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Berlin, Heidelberg, DE, 300 s.

FAO, 2008. Yearbook of Fishery Statistics. In: World Aquaculture Production by Species Groups. <http://ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm>. Navštíveno 21. 5. 2014.

Gela, D., Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench (*Tinca tinca* L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. Journal of Applied Ichthyology 19: 132–133.

Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 78: 24 s.

Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 126, 45 s.

Guinness world records: http://www.guinnessworldrecords.com/world-records/4000/most- expensive-caviar. Navštíveno 21. 5. 2014

IUCN, 2010. http://www.iucnredlist.org/news/sturgeons-highly-threatened. Navštíveno 21. 5. 2014

Kazanski, B.N., Feklov, Yu.A., Podushka, S.B., Molodsov, A.N., 1978. Express metod for determining the degree of gonad maturity in sturgeon spawners. Rybnoe Khozajstvo 2: 24–27.

Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on fertilization process in sturgeon *(Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science 117: 147–154.

Rodina, M., 2006. Application of image analysis for the determination of nucleus position in sturgeon oocytes. Journal of Applied Ichthyology 22: 175–176.

Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Inoue, K., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E., 2014. The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. Plos One 9: e86861.

Takeda, N.; Kusuda, S.; Teranishi, T.; Imada, K., 2002. Effect of iron concentrations on hatching rates of adhesive-eliminated Osmerid fish (*Sprinchus lanceolatus*) eggs from the surface. Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery 56: 107–113 (In Japanese with English Abstract).

Wuertz, S., Gröper, B., Gessner, J., Krüger, T., Luckas, B., Krüger, A., 2009. Identification of caviar from increasing global aquaculture production – dietary capric acid as a labelling tool for CITES implementation in caviar trade. Aquaculture 298: 51–56.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on fertilization process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science 117: 147–154. (dedikace: MSM6007665809, GAČR 524/06/0817).

Poděkování

Autoři publikace děkují Mgr. Zuzaně Linhartové za fotodokumentaci vytvořenou na laboratorním vybavení FROV JU: stereomikroskop Leica M165FC, Německo vybavený kamerou Leica DFC425C, Německo.

Externí odborný oponent

Mgr. Jan Štundl
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie,
Viničná 7, 128 43 Praha 2

Interní odborný oponent

Ing. Miloš Havelka, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury
a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Oponent za státní správu

Ing. Vladimír Gall
MZe Praha
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230) Těšnov 17,
117 05 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č.153/89037/2014-16230
Nmet CERTIFIKOVANÁ METODIKA ze dne 23. 12. 2014

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství,
Sekce lesního hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství,
Těšnov 17, 117 05 Praha 1.

Adresa autorského kolektivu

Ing. Martin Pšenička, Ph.D. – 50 %
Taiju Saito, MSc., Ph.D. – 25 %
Ing. Marek Rodina, Ph.D. – 25 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz;
odborný editor: MVDr. Jitka Kolářová, Ing. Antonín Kouba, Ph.D.,
redakce: Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2014;
vytištěna v roce 2014;
grafický design a technická realizace: Profi-tisk group, s.r.o.

Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Edice Metodik

ISBN 978-80-7514-018-0

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu OP Rybářství 2007–2013:
Metodiky IV (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00479

EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“