



# Hormonálně řízená reprodukce lososovitých ryb

*V. W. Švinger, J. Kouřil*





**FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD**  
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

# Hormonálně řízená reprodukce lososovitých ryb

---

*V. W. Švinger, J. Kouřil*

**Vodňany**

**2012**

**VDÁNÍ METODIKY JE USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:  
OP RYBÁŘSTVÍ PŘÍPRAVA A VDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2012  
(CZ.1.25/3.1.00/11.00381)**



**EVROPSKÁ UNIE**

**EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND**

**„Investování do udržitelného rybolovu“**

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektu:

**20 % – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA**

**(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)**

**20 % – Chovatelské a environmentální aspekty akvakultury a hydrocenóz**

**(GA JU 047/2010/Z)**

**10 % – Freundovo inkompletní adjuvancium jako nosič syntetického analogu GnRHa v hormonální indukci a synchronizaci ovulace síha peledě (Coregonus peled)**

**(GA JU 025/2011/Z)**

**20 % – Environmentálně a hormonálně indukovaná reprodukce, anestézie, raný ontogenetický vývoj a odchov hospodářsky významných druhů ryb**

**(ME10126, KONTAKT, MŠMT ČR)**

**a pilotního projektu**

**30 % – Ověření technologie hormonální synchronizace umělého výtěru jikernaček lososovitých ryb**

**(OP Rybářství CZ.1.25/3.4.00/10.00314)**



č. 123

ISBN 978-80-87437-63-6

<b>1. CÍL</b>	<b>6</b>
<b>2. VLASTNÍ POPIS METODIKY</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Úvod</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Hormonální osa „mozek – hypofýza – gonády“</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Účinnost molekul GnRH<sub>a</sub> u salmonidů</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Regulační mechanismy reprodukčního cyklu salmonidů</b>	<b>9</b>
2.5.1. Fotoperioda	9
2.5.2. Teplota	10
2.5.3. Teplota a dopaminní inhibice sekrece LH u salmonidů	13
<b>2.6. Hormonální přípravky a nosiče GnRH<sub>a</sub> (GnRH<sub>a</sub> delivery systems)</b>	<b>14</b>
2.6.1. Okamžitá (akutní) hormonální stimulace	14
2.6.2. Doporučené komerční přípravky s okamžitým účinkem GnRH pro salmonidy	21
2.6.3. Hormonální stimulace s postupným uvolňováním GnRH <sub>a</sub>	22
<b>2.7. Termín aplikace</b>	<b>28</b>
<b>2.8. Kvalita jiker a termín výtěru po aplikaci GnRH<sub>a</sub></b>	<b>29</b>
2.8.1. Dávka GnRH <sub>a</sub>	29
2.8.2. Zralost jiker	29
2.8.3. Druhá příslušnost	33
2.8.4. Morfologické charakteristiky jiker	33
<b>2.9. Zdravotní stav hormonálně ošetřených jikernaček v povýtěrovém období</b>	<b>34</b>
<b>2.10. Doporučovaná hormonálně řízená reprodukce vybraných druhů salmonidů</b>	<b>34</b>
2.10.1. Siven americký	34
2.10.2. Pstruh duhový	36
2.10.3. Síh peled'	37
2.10.4. Pstruh obecný f. jezerní	39
2.10.5. Pstruh obecný f. potoční	40
2.10.6. Lipan arktický a lipan podhorní	43
<b>2.11. Závěr</b>	<b>43</b>
<b>3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b>	<b>44</b>
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b>	<b>44</b>
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b>	<b>44</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b>	<b>45</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b>	<b>53</b>
<b>PODĚKOVÁNÍ</b>	<b>54</b>

## 1. CÍL

Cílem této metodiky je poskytnout pstruhařské praxi návod k provádění akcelerace či synchronizace ovulace u většiny středoevropských druhů lososovitých ryb s využitím syntetických analogů gonadotropin uvolňujících hormonů (GnRH<sub>a</sub>).

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

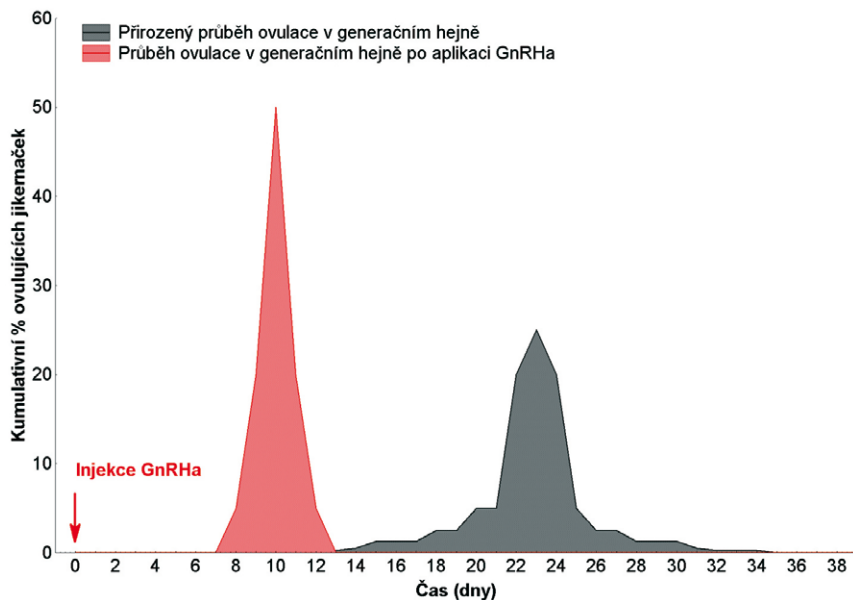
### 2.1. Úvod

V českém pstruhařství se v současné době používají klasické metody umělé reprodukce bez akcelerace či synchronizace ovulace pomocí hormonálních přípravků. I přes řadu úspěšných pokusů s hormonální synchronizací ovulace u lososovitých ryb (salmonidů), včetně úpravy světelného režimu, realizovaných v zahraničí, nejsou tyto postupy v ČR prozatím využívány.

Salmonidé se mohou vyznačovat značně asynchronním dozráváním a výtěrová sezóna se tím může prodloužit do období dvou či více měsíců (Breton a kol., 1990) (obr. 1). Typickými zástupci salmonidů s dlouhou dobou výtěrové sezóny jsou např. pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) siven arktický (*Salvelinus alpinus*) a siven alpský (*Salvelinus umbla*). Vlastní zralost jiker, tzn. čas ideální výtěrové zralosti jikernaček, trvá u salmonidů pouze 7 dní (Leitritz, 1969), proto musí být ovulující jikernačky vybírány alespoň jedenkrát týdně. Hormonální zásah slouží k synchronizaci výtěrů v délce týdne či několika dní. Významně tedy snižuje manipulaci a stres generačních ryb, ulehčuje plánování výtěrových prací na líhních, snižuje náklady a riziko spojené s dlouhým obdobím odchovu jikernaček ve výtěrové sezóně. Rovněž může přispět ke zvýšení kvality a kvantity získaných jiker a to díky přesné identifikaci stupně zralosti jikernaček.

Hormonální akcelerace ovulace je využitelná ve výtěrovém období u velmi náchylných druhů salmonidů jako je hlavatka podunajská (*Hucho hucho*), lipan podhorní (*Thymallus thymallus*), lipan arktický (*Thymallus arcticus*), pacifické druhy lososů (*Oncorhynchus sp.*), siven americký (*Salvelinus fontinalis*) a síhové (*Coregonidae*), u kterých hrozí neúměrné omezení produkce jiker ať již z důvodů vysoké předvýtěrové mortality nebo stresu z náhlé změny chovného prostředí (Jungwirth a kol., 1979, Mikolajczyk a kol., 2008; Švinger a kol., 2012c).

Nutno dodat, že u salmonidů není bezpodmínečně nutný hormonální zásah, protože výtěrové zralosti dosáhnou i bez hormonální stimulace. Hormonální akceleraci či synchronizaci ovulace je nutno brát jako dostupnou alternativu, která může zvýšit flexibilitu a operativnost současně užívaných postupů v reprodukci salmonidů. Hormonální zásah se musí přímo vztáhnout k momentálním podmínkám a potřebám odchovných zařízení, které jsou vždy velmi rozdílné.



**Obr. 1.** Schéma průběhu výtěrové sezóny u „standardizovaného“ generačního hejna pstruha duhového a vliv hormonálního zásahu na její zkrácení a synchronizaci.

## 2.2. Hormonální osa „mozek – hypofýza – gonády“

Reprodukční cyklus ryb je řízen tzv. hormonální osou (kaskádou) „mozek-hypofýza-gonády“. Centrální řídicí roli v této kaskádě hrají nativní forma gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH – **Gonadotropin Releasing Hormone**), někdy také označovaná jako luteinizační hormon uvolňující hormon (LHRH – **Luteinizing Hormone Releasing Hormone**). GnRH je neurodecapeptid, který patří mezi hypotalamické neurotransmitery sekretované neurony u kostnatých ryb (*Teleostei*) přímo inervujícími hypofýzu (Amano, 2010).

Je známo, že u každého druhu dochází k výskytu dvou nebo tří molekulárních forem GnRH (Oka, 1997; Okubo a Nagahama, 2008). V mozku lososovitých se na rozdíl od např. plátýsovitých (Pleuronectidae) či mořanovitých (Sparidae) nachází oproti třem pouze dvě molekulární formy, a to lososí (*salmon*) sGnRH a slepičí (*chicken*) cGnRH-2 (Okuzawa a kol., 1990). Vysoké množství sGnRH v hypofýze salmonidů napovídá, že tato forma GnRH stimuluje ve výtěrovém období syntézu a sekreci luteinizačního hormonu (dále jen LH), dříve označovaného jako GTH-II (Breton a kol., 1998), a do určité míry folikulostimulačního hormonu FSH neboli GTH-I v období vitelogeneze (Ando a kol., 2004; Amano a kol., 2010; Zohar a kol., 2010).

FSH tedy hraje svou dominantní roli v období vitelogeneze (Kawauchi a kol., 1989; Swanson a kol., 1989), kdy přímo působí na buněčnou vrstvu folikulárních obalů produkující testosteron, který je aromatizován pomocí enzymu P450 aromatázy (dále jen P450<sub>arom</sub>), produkovaném granulózní vrstvou buněk folikulů, na 17 $\beta$ -estradiol (dále jen E<sub>2</sub>) (Pankhurst a Carragher, 1991; Nagahama, 1994). E<sub>2</sub> stimuluje syntézu vitelogeninu v játrech, odkud je vitelogenin krevním řečištěm transportován pro vlastní uložení do rostoucích oocytů (Specker a Sullivan, 1994).

K nárůstu LH v krevní plazmě salmonidů dochází na počátku výtěrové sezóny při finálním dozrávání gonád. Současně s nárůstem hladiny LH dochází k náhlému nárůstu zrání indukujícího steroidu 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (dále jen DHP) (Young a kol., 1983), který je produkován granulózní buněčnou vrstvou folikulů, a to konverzí produkovaného 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteronu (dále jen 17P). Konverze je zprostředkována enzymem 20 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázou (dále jen 20 $\beta$ -HSD), jejíž produkce je stimulována rovněž pomocí LH (Young a kol., 1986). DHP aktivuje zrání podporující faktor, jež je finálním induktorem zrání oocytů (Nagahama a Yamashita, 2008). Typická migrace zárodečného jádra k animálnímu pólu je považována za indikátor počátku zrání oocytů, po němž následuje zhroucení zárodečného jádra a oddělení prvního polárního tělíška, což znamená kompletaci prvního meiotického dělení (Nagahama, 1994).

Aby mohly být zralé oocyty oplozeny, musí být z obklopujícího folikulu uvolněny v procesu zvaném ovulace (Goetz a Garczynski, 1997). Ovulace má dvě části – folikulární separaci – přerušení mikrovilárních spojení mezi stěnou folikulu a oocytem, a prasknutí folikulů – otevření folikulární stěny a vypuzení oocytu (Goetz a Garczynski, 1997). Esenciální roli v těchto finálních procesech hrají proteolytické enzymy (Ogiwara a kol., 2005) a prostaglandiny (Bradley a Goetz, 1994). Z hlediska hormonální kontroly procesu ovulace se v současnosti uvažuje o DHP jako klíčovém hormonu nejen pro indukci finálního zrání oocytů, ale i ovulace (Nagahama a Yamashita, 2008).

Aplikací syntetických analogů GnRH je ovulace synchronizována či akcelerována prostřednictvím výše popsané hormonální osy. Injekce GnRHa stimuluje syntézu a sekreci LH v hypofýze, který indukuje ovariální produkci DHP s následnou ovulací. Injekce GnRHa tedy působí na úrovni hypofýzy. Tím se zásadně liší od starších metod využívajících hypofyzaci či aplikaci purifikovaných GTH, jejichž účinek spočívá v přímé stimulaci ovariální produkce DHP.

---

### 2.3. Účinnost molekul GnRHa u salmonidů

---

Účinnost různých molekul GnRH se může značně lišit (Nagahama a kol., 1995). V zásadě je tato vlastnost GnRHa hodnocena dle potence stimulovat hypofyzární sekreci LH. Nativní formy GnRH mají obecně nižší potenci ve srovnání s jejich syntetickými superaktivními (vysoce aktivními) analogy (Forniés a kol., 2003). Substituce D aminokyseliny na pozici 6 a modifikace karboxyterminálního konce z glycin amidu na etyl amid



nativní molekuly GnRH způsobuje vysokou rezistenci syntetických analogů GnRH k endoenzymatické degradaci, která značně přispívá k jejich vyšší účinnosti (Zohar a kol., 1990). U pstruha duhového však rezistence vůči těmto degradačním procesům nebyla prokázána a nebyla tak prokázána příčina superaktivity GnRH<sub>a</sub> (Weil a kol., 1992). Ta je spíše výsledkem toho, že modifikace na pozici 6 a 10 nativních peptidů zvyšují afinitu k hypofyzárním GnRH receptorům, což vede ke zvýšené biologické aktivitě GnRH<sub>a</sub> (Crim a kol., 1988).

U lososovitých ryb, jmenovitě u pstruha duhového, byl oproti jiným testovaným analogům nejúčinnější stimulant sekrece LH superaktivní analog lososího nativního peptidu [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> (Breton a kol. 1990). Naopak nejnižší účinnost byla prokázána u analogu [D-Trp<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> (Breton a kol. 1990). Van der Kraak (1987) u D-Ala<sup>6</sup> and D-Arg<sup>6</sup> derivátů nativního lososího GnRH rovněž prokázal vysokou účinnost a zároveň stimulaci nejdéle trvající sekrece LH u lososa kisuče. U lososa obecného byl [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> opět vysoce účinný, přičemž nejvyšší superaktivita byla prokázána u analogu savčího peptidu [D-hArg(Et<sub>2</sub>)<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-mGnRH<sub>a</sub> (Crim a kol., 1988). Crim a kol. (1988) ve stejné studii popisuje nejvyšší účinnost molekul [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub>, [D-hArg(Et<sub>2</sub>)<sup>6</sup>-Trp<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>]-sGnRH<sub>a</sub> a [D-hArg(Et<sub>2</sub>)<sup>6</sup>-Trp<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> z hlediska nejdéle trvající stimulace sekrece LH, což má u salmonidů zásadní význam (kapitola 2.6.4.).

Vzhledem k vysoké aktivitě a pořizovací ceně se zdá jako nejvýhodnější používání analogu [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub>. Tento analog je současně účinnou látkou komerčně vyráběných přípravků jako je kanadský Ovaplant<sup>®</sup> a OvaRH<sup>™</sup>. Pro příklad cena 100 µg neméně vysoce účinného analogu [D-Ala<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> je 19,8 €, zatímco stejné množství [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> je možné obdržet za 4,76 € (Bachem AG, Švýcarsko, <http://www.bachem.com/>).

---

## 2.5. Regulační mechanismy reprodukčního cyklu salmonidů

---

### 2.5.1. Fotoperioda

---

Salmonidé dosahují pohlavní zralosti jednou za rok. Dlouhodobě byla diskutována otázka kontroly vývoje gonád a termínu pohlavní zralosti. Při řešení této otázky vyšlo najevo, že salmonidé intenzivně registrují světelnou délku dne a termín pohlavní zralosti je řízen její změnou prostřednictvím pineální sekrece melatoninu (Porter a kol., 1999). Pohlavní zralost u většiny salmonidů nastává přibližně 5-8 měsíců po období nejdelších dnů v roce (po 21.6.). Fotoperioda je tedy nejdůležitějším řídicím faktorem reprodukčního cyklu salmonidů (Bromage a kol., 1992a) a rovněž klíčem k jejich komerční akvakultuře (Nordgarden a kol. 2005). V současné době se různé metody regulace světelného prostředí (fotostimulace) ve výrobním procesu používají např. pro oddálení či urychlení termínu výtěrů v řádu několika měsíců (Bromage a kol., 1992a; Taranger a kol., 2010), k urychlení a spuštění pohlavního dospívání v průběhu smoltifi-

kace (Fjelldal a kol., 2011), ke kontrole smoltifikace (Saunders a kol., 1985), inhibici tzv. grilisingu neboli pohlavního dospívání u lososa obecného po 1½ roku odchovu ve slané vodě (Porter a kol., 1999), hybridizaci různých druhů s odlišným termínem výtěrové sezóny (Aschenbrenner Peter, 2010, osobní sdělení) a k stimulaci růstu u různých věkových skupin a druhů (Kråkenes a kol., 1991).

Pro detailnější popis regulační funkce fotoperiody v této publikaci není prostor, protože je nesmírně rozsáhlá a svým významem jen nepatrně zasahuje do problematiky kontroly ovulace. Tento odstavec pouze slouží pro zdůraznění její hlavní řídicí funkce a možnosti využití fotostimulace k posunu termínu výtěrů s následnou indukcí a synchronizací ovulace s využitím GnRHa (Taranger a kol., 2003; Bonnet a kol., 2007; King a Pankhurst, 2007). V případě posunutí termínu výtěru pomocí fotostimulace (opoždění či urychlení) může nastat situace, že finální dozrávání, samotná ovulace a výtěr jikernaček může probíhat za jiných teplot, než by tomu bylo v běžném výtěrovém období (podzim, zima) (Taranger a kol., 2003). Hlavní řídicí faktor reprodukčního cyklu (fotoperioda) se tedy může dostat do stavu „*out of phase*“ (desynchronizace) s hlavním modulačním faktorem, teplotou.

### 2.5.2. Teplota

---

Teplota je hlavním modulačním faktorem reprodukčního cyklu salmonidů (Pankhurst a King a kol., 2010) a na posun termínu výtěrů má nepatrný vliv (Hokanson a kol., 1973; King a kol., 2003). Při provádění hormonálních zásahů pomocí GnRHa má však teplota zásadní význam jak pro účinnost hormonálního zásahu, tak pro následnou kvalitu pohlavních produktů.

Reprodukční cyklus se dá rozdělit na dvě fáze: 1) proliferace, růst a diferenciací gamet (vitelogeneze, spermatogeneze) 2) období zrání oocytů a spermií a příprava na jejich uvolnění (finální dozrávání oocytů a spermiace) (Mylonas a Zohar, 2001). Každý druh ryb se vyznačuje vlastním fyziologickým teplotním optimem pro průběh endokrinních procesů, které se podílejí na řízení jednotlivých fází. Při odchovu generačních lososovitých ryb platí staré pravidlo říšmistrů, že určitá suma denních stupňů *per annum* nesmí být překročena, jinak lze očekávat problémy s přezráváním pohlavních produktů a jejich nedostatečnou kvalitou (Mayer, 2001). Pro tyto účely je nutné generační ryby chovat v nejlhřejších nádržích na odchovném zařízení. Reprodukční endokrinologie většiny významných druhů lososovitých ryb byla předmětem výzkumu v 80. a 90. letech minulého století (Bromage a kol., 1982; Springate a kol., 1985; Mayer a kol., 1992).

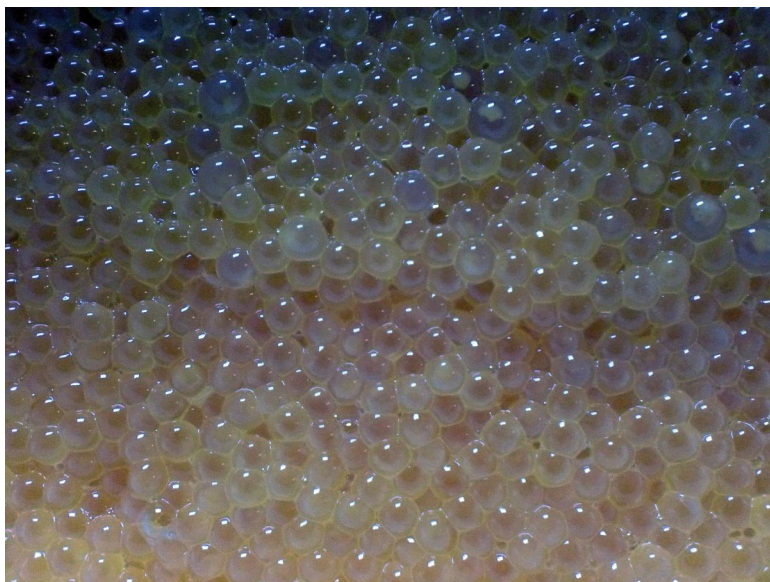
Vitelogeneze, fáze rapidního ovariálního růstu charakterizovaná hepatickou produkcí a ovariálním vstřebáváním prekurzoru žloutkového proteinu vitelogeninu (Speccker a Sullivan, 1994), probíhá po několik měsíců reprodukčního cyklu jikernaček. Během vitelogeneze oocyty zvětšují svou velikost až o několik řádů a vitelogenin může

představovat více než 90% jejich objemu (Tyler a kol., 2000). Protože výtěrové období salmonidů většinou spadá do období podzimu a zimy, velká část vitelogenického růstu oocytů probíhá během léta a raného podzimu (Bromage a Cumaranatunga, 1988) v období, kdy přirozené teploty mají tendenci k vyšším hodnotám.

Pohlavně dospívající jikernačky lososa obecného chované po dobu 3 měsíců od raného stadia vitelogeneze při teplotách 16, 18 a 22 °C vykazovaly známky jejího narušení ve srovnání s jikernačkami chovanými při teplotě 14 °C (King a kol., 2003). Na endokrinní úrovni se narušená vitelogeneze projevila sníženými hladinami  $E_2$ , jeho prekurzoru testosteronu (T) a zrovna tak i vitelogeninu. Změny ovulovaných oocytů byly patrné pro teplotu 22 °C redukcí jejich velikosti a poruchou tvorby jikerných obalů (Hyllner a Haux 1995) s deformací mikropilárního otvoru (King a kol., 2003). King a kol. (2003) se domnívali, že zvýšené teploty vyvolávají změny prostřednictvím snížení aktivity enzymatického systému cytochromu P450<sub>arom</sub> zodpovědného za konverzi T na  $E_2$ , což bylo potvrzeno o rok později Wattsovou a kol. (2004). Identické změny na oocytech jako u lososa obecného byly pozorovány i u sivena arktického při 10 °C (Gillet a kol., 1991) a pstruha duhového při 21 °C (Pankhurst a kol., 1996).

Zvýšené teploty vodního prostředí jsou rovněž známými inhibitory procesu zrání u lososovitých ryb (Taranger a Hansen, 1993; Gillet a kol., 2009; Taranger a kol., 2003; King a Pankhurst, 2004ab; Vikingstad a kol., 2008). Teplota nad 16 °C inhibovala ovulaci u sivena amerického (Hokanson a kol., 1973). U sivena arktického došlo k inhibici ovulace při 10 °C (Gillet a kol., 2009). Teplota 11 °C v předvýtěrovém období jikernaček lososa obecného oddaluje nástup finálního dozrávání a ovulace, oproti jikernačkám drženým při teplotě 6 °C (King a Pankhurst, 2004a). Naopak teplota 6 °C má velmi pozitivní efekt na synchronizaci a stimulaci ovulace. Teplota 14–16 °C u jikernaček lososa obecného moduluje profily obsahů  $E_2$  a T a brání běžnému předovulačnímu nárůstu hladiny DHP se současnou inhibicí ovulace (Taranger a kol., 2003). Oocyty pstruha duhového při teplotě 18 °C vykazovaly *in vitro* vysokou aktivitu enzymu P450<sub>arom</sub> (tudíž i vyšší tendenci k produkci  $E_2$ ), proti nízké aktivitě enzymu 20 $\beta$ -HSD zprostředkovávajícího produkci steroidu DHP (Pankhurst a Thomas, 1998) (kapitola 2.2.). Aplikace GnRHa u jikernaček salmonidů při vyšších teplotách (u pstruha duhového při teplotě 18 °C, u lososa obecného při 14–16 °C, u sivena arktického při 10 °C) není účinná (Pankhurst a Thomas, 1998; King a Pankhurst 2004a; Gillet a Breton, 2009). Ztráta účinnosti GnRHa spočívá v jeho neschopnosti stimulovat hypofyzární sekreci LH (tedy i patrně sníženou citlivostí hypofýzy vůči GnRHa) a tedy i předovulační nárůst DHP v krevní plazmě. King a Pankhurst (2004a) namítají, že nízká schopnost folikulární produkce DHP může pocházet z nedostatku substrátu enzymu 20 $\beta$ -HSD, tedy 17P, pro jeho konverzi na DHP, jelikož při teplotě 16 °C u jikernaček lososa obecného byla aktivita 20 $\beta$ -HSD ještě přítomna. To by současně znamenalo narušení enzymatických procesů předcházejících produkci 17P (konverze cholesterolu na 17P přes pregnenolon a progesteron) (Nagahama, 1997), které jsou rovněž stimulovány zvýšením sekrece LH.

Zjednodušeně lze tedy říci, že vysoké teploty mohou být příčinou zhroutení celé reprodukční hormonální osy v období posledních stadií oogeneze vlivem snížení sensitivity hypofýzy vůči GnRH (Vikingstad a kol., 2008), inhibicí sekrece LH z hypofýzy (Gillet a Breton, 2009), snížené enzymatické aktivity patrně na úrovni 20 $\beta$ -HSD (Pankhurst a Thomas, 1998) a syntézy jejího substrátu 17P (King a Pankhurst 2004a). Dále snížením senzitivity folikulární odpovědi na stimulaci LH vzhledem k nedostatku folikulárních receptorů LH a/nebo jejich nižší afinitou k LH (Gillet a kol., 2011), což brání produkci DHP s následným opožděním či zastavením finálního meiotického dozrávání oocytů a ovulace (King a Pankhurst 2004a). Důležité je poznamenat, že tyto změny nejsou nevratné. Znovu nastartování normálně fungující reprodukční hormonální osy lze docílit přemístěním jikernaček do chladné vody (King a Pankhurst, 2004b; Gillet a Breton, 2009, Gillet a kol., 2011). Nicméně je potřeba se vyvarovat vystavení jikernaček dlouhodobějšímu působení vysokých teplot ve výtěrovém období, které způsobí prezrádní jiker ještě před jejich ovulací (obr. 2 a 3).



**Obr. 2.** Ukázka jiker jikernaček sivena obrovského (*Salvelinus namaycush*) připravovaných ve výtěrové sezóně při teplotě 9 °C. Na obrázku je vidět téměř 100 % prezrálých jiker. Tento druh salmonida vyžaduje, podobně jako siven arktický, podzimní pokles teploty vody na 4–5 °C (Aufseß, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 3.** Následná nulová oplozenost jiker sivena obrovského z předchozího obrázku dokumentuje špatnou kvalitu jiker z obrázku 2 (Aufseß, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

### 2.5.3. Teplota a dopaminní inhibice sekrece LH u salmonidů

Sekrece LH z hypofýzy podléhá stimulačnímu efektu GnRH a inhibičnímu efektu tzv. GRIF (*Gonadotropin Release-Inhibiting Factor*, inhibiční faktor sekrece gonadotropinu), dopaminu (Pasqualini a kol., 2004). Dopaminní inhibici sekrece LH nebyl v minulosti přikládán velký význam (Van der Kraak a kol., 1986). Nicméně jistý stupeň dopaminní inhibice u salmonidů existuje (Van der Kraak a kol., 1986; Gillet a kol., 1996). Samotné podání dopaminního inhibitoru totiž stimuluje sekreci LH (Billard a kol., 1984) a do určité míry indukuje ovulaci (Gillet a kol., 1996). Existence dopaminní inhibice sekrece LH u salmonidů byla definitivně potvrzena až nedávno francouzskými vědci Gilletem a Bretonem (2009) u sivena arktického při zvýšené teplotě (10 °C) během výtěrového období.

Dopaminní inhibice sekrece GnRH z hypotalamu a sekrece LH z hypofýzy patrně představuje prvotní kontrolní mechanismus, který brání uvolnění gamet (zejména oocytů) do nevhodných teplotních podmínek pro oplození a další vývoj. Siven arktický je nejseverněji rozšířeným salmonidem obvykle žijícím v teplotním rozmezí 0–10 °C (Johnson, 1980). Pro produkci vysoce kvalitních jiker je nutná teplota < 7 °C alespoň po dobu 1 měsíce před obdobím výtěrů (Johnston, 2002). Dopaminní inhibice sekrece LH u jiných druhů salmonidů je tedy patrně aktivována o něco vyššími teplotami, než je tomu např. u sivena arktického.

Negativní vliv vysokých teplot lze eliminovat hormonálním zásahem pomocí GnRHa v kombinaci s dopaminergními inhibitory (pimozid, domperidon, metoclopramid) (Gillet a kol., 1996). Nevýhodou nasazení dopaminergních inhibitorů je z neznámého důvodu vysoké snížení kvality jiker. Navíc Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/28/ES stanoví, že veterinární léčivé přípravky pro zvířata určená k produkci potravin mohou být registrovány pouze za podmínek, které zaručí, že získané potraviny budou neškodné pro spotřebitele, pokud jde o veškerá rezidua pocházející z těchto léčivých přípravků. Jelikož žádné reziduální limity pro dopaminní inhibitory nejsou stanoveny, je jejich využití v reprodukci ryb v současnosti nemožné. Vhodnější je použití metod zaručujících postupné uvolňování GnRHa (Vikingstad a kol., 2008) nebo jeho opakovanou injekci (Pankhurst a Thomas, 1998) (kapitola 2.6.3.). Tyto postupy jsou u salmonidů i za suboptimálních teplotních podmínek velmi účinné a obejdou se bez použití dopaminních inhibitorů.

---

## 2.6. Hormonální přípravky a nosiče GnRHa (GnRHa delivery systems)

---

### 2.6.1. Okamžitá (akutní) hormonální stimulace

---

Okamžitá hormonální stimulace, většinou označovaná jako akutní, spočívá v aplikaci GnRHa, který byl před použitím zředěn na požadovanou koncentraci v  $\mu\text{g}$  na jednotku (ml) 0,7–0,9% fyziologickým roztokem NaCl. Takto podaný GnRHa má okamžitý a krátkodobý účinek.

#### Výrobci a dodavatelé

Syntetický analog GnRH je pro přípravu akutního hormonálního zásahu možné objednat ve vysoce rozpustné krystalické formě (doručovací doby jsou dle potřeby 3–4 dny) u výrobců čistých chemikálií (*Sigma Aldrich*, [www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html](http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html)) či *Bachem AG*, *Hauptstrasse 144, 4416 Bubendorf, Švýcarsko*). Z naší osobní zkušenosti byla vždy nejlepší spolupráce se společností *Bachem AG* z hlediska provádění on-line objednávek, rychlosti a flexibility dodávání a vynikající technické podpory a poradenství. Firma *Bachem AG* dodává standardní  $[\text{D-Arg}^6\text{-Pro}^9\text{NET}]\text{-sGnRHa}$  v množství 5 a 25 mg. Pro představu jedno 25 mg balení stačí pro injekci minimálně 500 kg generačních ryb.

#### Manipulace s GnRHa a jeho skladování

Krystalická forma GnRHa je dodávána v termostatickém balíčku v umělohmotných ampulích zabalených do uzavíratelného PVC sáčku (obr. 4). Po obdržení balíčku je nutné GnRHa skladovat v mrazáku při teplotě  $< -15\text{ }^\circ\text{C}$ . Při teplotě  $45\text{ }^\circ\text{C}$  (například v létě

v rozpáleném autě) si GnRHa ([D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRHa) uchovává svou 100% účinnost přibližně 3–4 hodiny, při pokojové teplotě 20 °C je 100% účinnost garantována ještě zhruba po 24 h (Bachem AG). GnRHa je možné skladovat zamražené ve fyziologickém roztoku v požadované koncentraci v jakýchkoli čistých plastových ampulích či drobných nádobkách při teplotě < -15 °C. Takto skladované GnRHa je ještě po roce 100% účinné. GnRHa nesmí být vystavováno přímému slunečnímu záření. Práce se syntetickými analogy GnRHa vyžaduje základní ochranné pomůcky, především latexové rukavice a provádění příprav v dobře odvětrané místnosti.



**Obr. 4.** *Plastové ampule s lososím GnRHa v krystalické formě dodané firmou Bachem AG.*

#### **Příprava okamžitého hormonálního zásahu**

Před vlastní přípravou GnRHa je nutné mít přehled o přibližné individuální a celkové hmotnosti jikernaček v generačním hejně k naplánování množství GnRHa k injkaci. K ředění použijeme známý objem fyziologického roztoku NaCl předem připravený do čisté (nejlépe sterilizované) skleněné nádoby (nejčastěji kádinky). Pomocí pipety (nejlépe o objemu 50–1 000 µl) či injekční stříkačky s jehlou nejprve rozpustíme celkové množství krystalického GnRHa přímo v umělohmotné ampuli (obr. 4). GnRHa je velmi dobře rozpustný. Je nutné opět pomocí pipety či injekční stříkačky umělohmotnou ampuli důkladně vyprázdnit do připravené skleněné nádoby. Část rozpouštěného hormonu zmrazíme ve zkumavkách a část dále naředíme na požadovanou koncentraci GnRHa v µg/ml/kg živé hmotnosti jikernačky k přímé injkaci. Přebytky rozpouštěného a rozředěného GnRHa je nutné zamrazit a skladovat při teplotě -15 °C ve zkumavkách Eppendorf o objemu 1,5–2 ml. Vhodné pomůcky k ředění GnRHa jsou na obrázku 6.

*Příklad: Bylo zjištěno, že na hormonální stimulaci generačního hejna pstruha obecného je potřeba přibližně 6 000  $\mu\text{g}$  sGnRHa. K dispozici máme 25 mg balení sGnRHa. Injikovat budeme 25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  sGnRHa.*

*Postup řešení:*

- 1) *Do skleněné kádinky si pomocí skleněné pipety (obr. 5) připravíme 25 ml fyziologického roztoku, který bude použit k ředění.*
- 2) *Pomocí injekční stříkačky (obr. 5) rozpustíme krystalické sGnRHa v ampuli od dodavatele.*
- 3) *Ampuli pomocí injekční stříkačky důkladně vyprázdníme do skleněné kádinky (nyní máme připravený roztok sGnRHa o koncentraci 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).*
- 4) *19 ml roztoku z kádinky rozdělíme nejlépe po 1 ml do zkumavek k zamrazení.*
- 5) *Zbylých 6 ml použijeme k vlastní injikaci a postupujeme dle výpočtu:*

$$6\ 000 / 25 = 240\ \text{ml}$$

$$240 - 6 = \underline{\underline{234\ \text{ml}}}$$

*6 ml roztoku je nutno naředit 234 ml fyziologického roztoku, abychom obdrželi finální koncentraci k injikaci a to 25  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$  sGnRHa na kg hmotnosti jikernačky.*

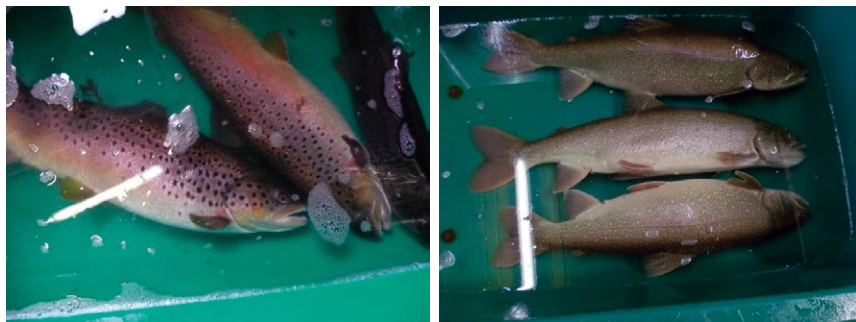




**Obr. 5.** Pomůcky pro ředění a přípravu GnRHa k aplikaci. Objemy pipet a injekčních stříkaček je nutné volit dle celkového množství a individuální hmotnosti jikernaček. Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

### **Aplikace GnRHa s okamžitým účinkem**

Před vlastní injikací se jikernačky anestetizují v lázni hřebíčkového oleje ( $0,3\text{--}0,4\text{ ml}\cdot 10\text{ L}^{-1}$ ) či MS 222 ( $1\text{ g}\cdot 10\text{ L}^{-1}$ ) (obr. 6). Pro přesné určení dávky je nutné každou jikernačku individuálně zvážit (obr. 7). K aplikaci GnRHa se používají injekční stříkačky o objemu 1 ml pro generační ryby o hmotnosti < 1 kg, o objemu 2–5 ml a výše pro generační hejno s individuální hmotností > 2 kg (obr. 8). Pro velmi jemné šupiny a kůži sivenů, pstruhů a lososů lze použít jehly tenčí určené pro aplikaci inzulínu. U velkých ryb na místo inzulínových jehel volíme dlouhé a tenké jehly (nejčastěji  $0,3 \times 12\text{--}0,7 \times 40\text{ mm}$ ). U salmonidů s hrubšími a většími šupinami (síhové, lipani) je vhodné použít jehly delší. Vlastní injikace GnRHa se provádí buď intramuskulárně do hřbetní svaloviny v oblasti mezi hřbetní ploutví a tukovou ploutvičkou pod úhlem zavedení jehly cca  $45^\circ$ , nebo intraperitoneálně na bázi břišní ploutve pod ostrým úhlem zavedení jehly  $20\text{--}30^\circ$  (obr. 8 a 9), aby vpichem nedošlo k poškození vnitřních orgánů. Z vlastní zkušenosti nedoporučujeme intramuskulární aplikaci, protože je oproti intraperitoneální aplikaci zdlouhavá a vyžaduje masáž místa vpichu (obr. 10), aby nedošlo k úniku aplikovaného přípravku.



**Obr. 6.** Anestezie jikernaček pstruha obecného f. jezerní (*Salmo trutta m. lacustris*) a sivena obrovského v anestetiku MS 222 před manipulací (Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 7.** Individuální zvážení každé jikernačky je zásadní před provedením akutní injekce. Na obrázku anestetizovaná jikernačka pstruha obecného f. potoční (*Salmo trutta m. fario*) (generační hejno Main, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 8.** Intraperitoneální injekce sGnRH<sub>a</sub> u jikernaček pstruha obecného f. jezerní (generační hejno Bodensee, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 9.** Detailní zobrazení vpichu při intraperitoneální injekci sGnRH<sub>a</sub> jikernače pstruha obecného f. jezerní (generační hejno Bodensee, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 10.** Intramuskulární injekce přípravku Supergestran® jikernačce síha peledě (generační hejno Žďár n. Sázavou). Po intramuskulární aplikaci přípravku je nutná masáž injikovaného místa, aby došlo k dobrému vstřebání roztoku. Foto: Viktor Švinger a Jan Kouřil.



**Obr. 11.** Po anestezii je nutné generační ryby ponechat zotavit za dostatečného přísunu chladné čisté vody (na obrázku vytřené jikernačky sivena obrovského, Německo). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

**2.6.2. Doporučené komerční přípravky s okamžitým účinkem GnRH pro salmonidy****Supergestran®**

Přípravek Supergestran® (obr. 12) dodává společnost Nordic Pharma, s.r.o. (K Rybníku 475, 252 42 Jesenice, Česká republika) Jeho účinnou látkou je lecorelin – analog savčího GnRH [D-Tle<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-mGnRH<sub>a</sub>. Výhodou je, že je dodáván ve skleněných ampulích o objemu 2 ml a obsahem 25 µg.ml<sup>-1</sup> mGnRH<sub>a</sub>, což je dávka, která je přímo použitelná pro aplikaci generačním jikernačkám na 1kg živé hmotnosti. Skladuje se při teplotě 25 °C. Odpadá tedy nutnost chlazení a přípravného ředění. Po odlomení uzávěru skleněné ampulky lze započít s jeho naplňováním do injekčních stříkaček. Tyto vlastnosti se ukázaly jako velmi praktické v náročných podmínkách a rybářských provozech (Švinger a kol., 2012c). V případě nutnosti lze Supergestran® naředit fyziologickým roztokem NaCl i na nižší koncentraci, čímž lze docílit významné úspory nákladů. Nevýhodou je, že je dodáván pouze v koncentraci 25 µg.ml<sup>-1</sup>, což vyžaduje používání velkého objemu injikovaného roztoku velkým jikernačkám. Hodí se tedy spíše pro aplikaci menším rybám. Přípravek Supergestran® lze na recept veterinárního lékaře zakoupit v kterékoliv lékárně.



**Obr. 12.** Balení s ampulkami přípravku Supergestran®. Foto: Viktor Švinger.

### Gonazon™

Přípravek Gonazon™ je jediným skutečně registrovaným hormonálním přípravkem v EU obsahujícím GnRH<sub>a</sub>. Účinnou látkou je azagly-nafarelin D-Nal(2)<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>-[aza-Gly]-GnRH<sub>a</sub>. Je dodáván jako koncentrát, který je před použitím třeba naředit přibaleným sterilním ředidlem na 16–32 µg.ml<sup>-1</sup>, což představuje dávku tohoto hormonu na kg živé hmotnosti jikernaček. Vyráběn a dodáván je holandskou firmou Intervet International B. V. Bohužel v současné době není přípravek nikde v Evropě k dostání a firma Intervet International B. V. a její zástupci na toto téma nekomunikují jak v Holandsku a České republice, tak ani v Německu.

### OvaRH™

Produkt kanadské firmy Syndel Laboratories Ltd. (<http://www.syndel.com/>, 2595 McCullough Rd, Nanaimo, BC V9S 4M9, Kanada) OvaRH™. Obsahuje [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub>, který je dodáván ve skleněné lahvičce v krystalické formě v balení 1 mg (92 USD), 5 mg (410 USD) a 25 mg (1 900 USD). Před použitím se musí naředit na požadovanou koncentraci (dle výrobce 10 µg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti) pomocí fyziologického roztoku. Tento produkt se prakticky neliší od čistého krystalického sGnRH<sub>a</sub> dodávaného firmou Bachem AG (kapitola 2.6.1.).

### Syndel Laboratories Ltd.

Firma Syndel Laboratories Ltd. má třicetiletou tradici ve výrobě různých medikamentů a přípravků pro komerční akvakulturu v Kanadě a USA (Western Chemicals Inc.). Produkty dodává včas a spolehlivě i do Evropy (hlavně do Norska). Disponuje širokou technickou podporou a expertním poradenstvím jak na svých webových stránkách tak prostřednictvím e-mailu nebo telefonní linky. V průběhu prováděných pokusů, které jsou prezentovány v této metodice, byla velmi korektním dodavatelem s kvalitními poradenskými službami. Při provádění kontroly reprodukce u ryb jsou tyto vlastnosti dodavatelů nepostradatelné.

#### 2.6.3. Hormonální stimulace s postupným uvolňováním GnRH<sub>a</sub>

Jednorázová akutní injekce GnRH<sub>a</sub> není často schopna vyvolat vysoký stupeň synchronizace ovulace u celého generačního hejna jikernaček, nýbrž pouze u 10–50 % (Mylonas a kol., 1992; Taranger a kol., 1992; Švinger a kol., 2012b). Na jednorázovou dávku GnRH<sub>a</sub> většinou reagují pouze jedinci, kteří jsou fyziologicky nejbliže přirozenému termínu výtěru (Breton a kol., 1990). Proto je z hlediska použití akutního hormonálního zásahu vhodnější aplikaci GnRH<sub>a</sub> zopakovat po 2–3 dnech po první injekci. I když je dvojitá akutní injekce GnRH<sub>a</sub> velmi účinná, vyžaduje o jednu manipulaci s generačními rybami navíc. Z tohoto důvodu byly vyvinuty nosiče GnRH<sub>a</sub> neboli „*GnRH<sub>a</sub>-delivery systems*“, které zaručují jeho kontinuální a déle trvající uvolňování „*sustained hormone release*“, a to po dobu několika dní i týdnů (Breton a kol., 1990; Mylonas a Zohar, 2001).

### 2.6.3.1. Cholesterolové pelety

Cholesterolové pelety byly s úspěchem využity u pstruha duhového (Crim a kol., 1983b) a lososa atlantského (Crim a kol., 1983a). Kombinací cholesterolu, celulózy a práškového GnRH<sub>a</sub> (někdy za přidání kakaového másla) a komprese do peletované podoby vzniká cylindrický implantát s obsahem GnRH<sub>a</sub> v rozmezí 25–250 µg, který po implantaci do těla ryby na principu difuze postupně uvolňuje GnRH<sub>a</sub> (Mylonas a Zohar, 2001). Rychlost uvolňování GnRH<sub>a</sub> se dá nastavit poměrem cholesterol:celulóza (Carolsfeld a kol., 1988). Používání cholesterolových pelet je však sporné, protože cholesterol je steroidní prekurzor a pelety nejsou biodegradabilní, což může limitovat využití implantovaných jikernaček jako konzumních ryb (Breton a kol., 1990). Výraznou nevýhodou je, že preparace většího počtu pelet je časově velmi náročná z důvodu navazování GnRH<sub>a</sub> pro každou peletu zvlášť (Mylonas a Zohar, 2001). Proto je mnohem výhodnější nákup komerčních preparátů. Asi nejrozšířenějším komerčním přípravkem s protrahovaným uvolňováním GnRH<sub>a</sub> na bázi cholesterolových pelet je preparát firmy Syndel Laboratories Ltd., Ovaplant®.

#### Ovaplant®

Účinnou látkou preparátu Ovaplant® (obr. 13) je syntetický analog [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NE-t]-sGnRH<sub>a</sub> lososího GnRH. Pelety Ovaplantu® jsou dodávány v kruhových plastových zásobnících zabalených do uzavíratelné PVC přepravky. Každý zásobník obsahuje 24 peletovaných implantátů. Pro prvotní používání preparátu Ovaplant® je nutné objednat i nerezovou ocelovou implantační pistoli (obr. 13) s dutými implantačními jehlami o průměru 3 mm. Zásobníky s peletami jsou dodávány v koncentracích sGnRH<sub>a</sub> 75 µg (pro generační ryby o hmotnosti 3–5 kg, 240 USD), 150 µg (pro generační ryby o hmotnosti 6–8 kg, 300 USD), 250 µg (pro generační ryby o hmotnosti 9–14 kg, 360 USD). Pořizovací cena implantační pistole je 72 USD. Výhodou tohoto přípravku je jednoduchá příprava a velmi rychlá manipulace s implantací buď intramuskulárně nebo intraperitoneálně. Generační ryby není nutno před aplikací individuálně vážit, ale rozdělit do výše popsaných velikostních kategorií. Nevýhodou tohoto preparátu je, že není vhodný pro hormonální zásah u generačních hejn s kusovou hmotností < 3 kg (lipan, siven, pstruh obecný f. potoční i jezerní, síhové). Důvodů je několik: 1) příliš vysoká nákladovost (graf 1), 2) implantační jehla je příliš silná pro menší jikernačky, 3) nejnižší koncentrace je 75 µg na peletu, což v konečném výsledku u ryb s hmotností < 1 kg znamená dávku přesahující 75 µg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti, kterou nelze doporučit (kapitola 2.6.). Instruktaž použití přípravku Ovaplant® lze shlédnout na internetovém serveru YouTube™ pod adresou <http://www.youtube.com/watch?v=76u42Yfrrv4> nebo na internetových stránkách společnosti Syndel Laboratories Ltd.



**Obr. 13.** Balení přípravku Ovaplant® s implantační pistolí „Rall Gun“. Foto: Viktor Švinger.

### 2.6.3.2. Emulsifikace GnRHa pomocí Freundova inkompletního adjuvancia

#### Popis

Velmi flexibilním a praktickým nosičem GnRHa je Freundovo inkompletní adjuvancium (FIA). Pro tyto účely bylo FIA poprvé použito u pstruha duhového Arabacim a kol. (2004) a Vazirzadehovou (2008) a u lososa keta (Park a kol., 2007). Švinger a kol. (2012ab) využili sGnRHa-FIA (sGnRHa emulgované ve FIA) u síha peledě a sívena amerického. Nedávno byla tato metoda použita i u lipana podhorního a obou anadromně nemigrujících forem pstruha obecného. FIA je viskózní emulze minerálních olejů a v 1 ml obsahuje 0,85 ml parafinového oleje a 0,15 ml manid-monooleátu jako surfaktantu (tenzidu) (Guy, 2007). Po smíchání FIA a fyziologického roztoku s rozpuštěným GnRHa dojde k vytvoření *water-in-oil* emulze (emulze voda v oleji). Peptid GnRHa je „zachycen“ ve vodné fázi emulze a FIA slouží jako jeho nosič. Po aplikaci se GnRHa z emulze postupně uvolňuje, čímž je zajištěn kontinuální a dlouhotrvající účinek. Tato metoda je snadno použitelná i u generačního hejna o individuální hmotnosti < 0,5 kg (obr. 16).

#### Výrobci a dodavatelé

FIA lze zakoupit u výrobců laboratorních chemikálií jako např. Sigma Aldrich, VWR nebo Rockland (obr. 14). 100 ml FIA společnost Sigma Aldrich prodává za 5 915 Kč. Po dodání je nutno zajistit skladovací teplotu 2–8 °C.





**Obr. 14.** Balení s lahvičkami Freundova inkompletního adjuvancia (Freund's incomplete adjuvant) od firmy Sigma a firmy Rockland. Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

### Příprava GnRH<sub>a</sub>-FIA

Příprava GnRH<sub>a</sub>-FIA je velmi jednoduchá, levná a proveditelná bez větších technických nároků, přičemž dávku hormonu nemusíme přesně měřit na kg živé hmotnosti. Postačí pouze odhadnout živé hmotnosti generačních ryb a jim přizpůsobit přípravu hormonu. Standardní [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> (Bachem AG) se nejdříve naředí podle odhadnuté individuální hmotnosti generačních ryb na požadovanou koncentraci, kterou chceme podat na 1 kg živé hmotnosti, a to 0,25 ml 0,7% fyziologického roztoku NaCl (Př. *Chceme-li injikovat v průměru 4 kg těžké jikernačky pstruha duhového standardní dávkou 25 μg.kg<sup>-1</sup>, namícháme GnRH<sub>a</sub> v koncentraci 400 μg.1<sup>-1</sup> ml 0,7% NaCl = 100 μg/0,25ml 0,7% NaCl*). Takto naředěný GnRH<sub>a</sub> se důkladně mixuje s FIA v poměru 1 : 1 do vytvoření smetanově bílé viskózní emulze (obr. 15), která se posléze injikuje. Pro mixování lze použít jakýkoli účinný homogenizátor (např. Ultraturax Ika T-10), výkonný mixér či v případě nouze obyčejnou vrtačku, na kterou je místo vrtáku přimontována vhodná míchací lopatka (obr. 15). Výše uvedené hodnoty platí pro ryby o hmotnosti 4–5 kg. Je-li generační hejno příliš rozrostlé, je vhodné ho roztrdit na alespoň 2 velikostní skupiny tak, aby se dávka hormonu na odhadovaný kg živé váhy pohybovala v rozpětí ± 10 μg.



**Obr. 15.** Pro vmíchání GnRH do emulze FIA lze v nouzi využít elektrickou vrtačku. Jako nádoby pro míchání využijeme zkumavek z tvrdého PVC. Ty musí být upraveny (seřiznuty) tak, aby se injekční stříkačkou dosáhlo až na dno zkumavky. Při míchání vrtačkou je nutno zkumavku utěsnit víčkem s parafínem. Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

### Aplikace GnRHa-FIA

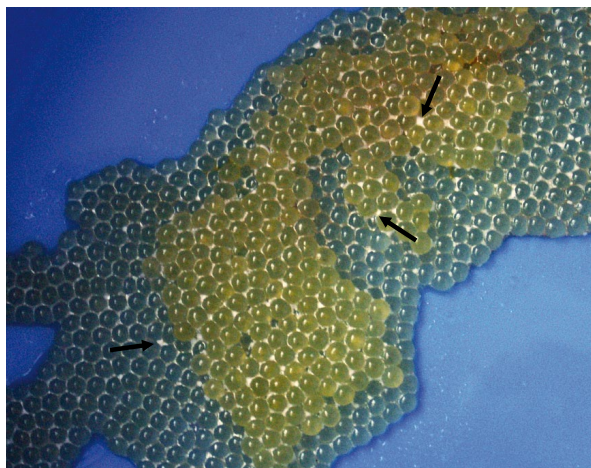
Pro aplikaci jsou velmi vhodné inzulínové injekční stříkačky dodávané bez pevných jehel o objemu 1 ml (obr. 16). Kvůli snadnějšímu plnění se jehly nasazují až po naplnění injekčních stříkaček. Dle výše uvedeného výpočtu obdrží každá jikernačka s odhadovanou hmotností 4-5 kg celkový objem 0,5 ml emulze GnRHa-FIA a není nutné před aplikací každou jikernačku individuálně vážit. Před vlastní aplikací je nutné naplnit tolik stříkaček, kolik máme generačních ryb k injikaci. Pro injikaci 100 ks potřebujeme asi 2 h pro přípravu a naplnění GnRHa-FIA do injekčních stříkaček. GnRHa-FIA se aplikuje **výlučně intraperitoneálně**, dle postupu v kapitole 2.8.1. (obr. 16). Při aplikaci je nutné injekční jehlu pevně držet na násadci injekční stříkačky, neboť i jemné znečištění olejovou emulzí může způsobit, že jehla v důsledku tlaku při aplikaci sklouzne a přijdeme tak o cennou dávku. Z tohoto důvodu doporučujeme využívat injekční jehly o větším průměru (nejlépe 0,7 × 30–40 mm), které viskózní kapalině kladou mnohem menší odpor.



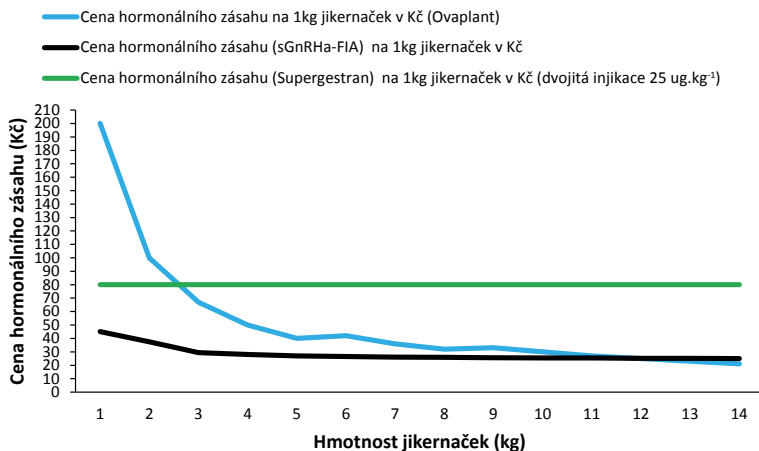
**Obr. 16.** Hormonální zásah u jikernačky lipana podhorního (cca 300g) původem z řeky Loučné s viditelným využitím bílé zabarveného GnRHa-FIA (Litomyšl, Česká republika). Foto: Viktor Švinger a Petr Trnka.

## Specifika při výtěru

Při výtěru dojde k vypuzení většiny množství emulze z dutiny břišní společně s jikrami ve formě drobných bílých vloček o velikosti 0,3–1,5 mm (obr. 17). Na oplozenost jiker tato skutečnost nemá žádný negativní vliv.



**Obr. 17.** Bílé vločky (zvýrazněny černými šipkami) emulze GnRHa-FIA ve vytřených jikrách sivena amerického. Foto: Viktor Švinger.



**Graf 1.** Cena hormonální injekce v přepočtu na 1 kg živé hmotnosti jikernaček u přípravku Ovaplant®, Supergestran® a metody GnRHα-FIA (u metody GnRHα-FIA se počítá s dodáním [D-Arg6-Pro9NET]-sGnRHα od firmy Bachem AG a standardní dávkou 25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti jikernaček). Na grafu je vidět, že přípravek Ovaplant® je připraven na použití především pro generační ryby o individuální hmotnosti > 7 kg. Cena použití přípravku Supergestran® se dá např. u lipana arktického či síha peledě snížit, protože i dvojnásobná dávka 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti je vysoce účinná.

## 2.7. Termín aplikace

Obecně lze s hormonálními zásahy u jikernaček salmonidů začít v rozmezí 1 až 5 týdnů před obdobím hlavního přirozeného výtěrového období. To platí především pro sivena amerického, síha peledě, lipanů či pstruha obecného f. jezerní, kde výtěrová sezóna trvá přibližně 3 týdny až 1,5 měsíce. K určení tohoto období spolehlivě poslouží záznamy o výtěrech z minulých let. Vzhledem k důvodům zmíněným v podkapitolách 2.5.2. a 2.5.3 je nejvhodnější termín aplikace posunout o několik dnů po skokovém snížení podzimních či zimních teplot vody (Taranger a kol., 1992; Švinger a kol., 2012a).

Oproti tomu výtěrová sezóna různých populací pstruha duhového (s jarním či podzimním výtěrem) může být roztažena do období delšího než 3 měsíce. Proto je vždy vhodné začít s hormonální stimulací přibližně na jejím začátku, když se v generačním hejné objeví první ovulující jikernačky. Dřívější hormonální stimulaci nedoporučujeme, protože účinek urychlené ovulace se nemusí projevit v dobré kvalitě jiker. Pro tyto účely není nutné generační hejno kontrolovat, ale opět sledovat data prvních výtěrů z minulých let. Podobně dlouhé výtěrové období jako pstruh duhový má např. siven alpský, siven arktický a někdy i pstruh obecný f. potoční.

---

## 2.8. Kvalita jiker a termín výtěru po aplikaci GnRHa

---

I přesto, že následná kvalita jiker rozhoduje o hospodárnosti/ztrátovosti hormonálně kontrolovaného výtěru, není v této oblasti příliš mnoho záznamů. Veškerá dostupná literatura, která alespoň z části do této problematiky zasahuje, se značně rozchází. Existují prameny, které popisují jak snížení tak i zvýšení kvality jiker po hormonální stimulaci. Existuje nicméně několik teorií, které více či méně změnu kvality jiker hormonálně ošetřených jikernaček zdůvodňují.

---

### 2.8.1. Dávka GnRHa

---

První teorie předpokládá, že snížení oplozenosti je způsobeno aplikací příliš vysokých dávek GnRHa ( $100\text{--}150\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ŽH) (Haraldsson a kol. 1993; Olito a kol. 2001) či podání GnRHa v kombinaci s dopaminergním inhibitorem, což může vést k hyperstimulaci hypofýzy a sekreci vysokého množství LH, které má patrně negativní vliv na kvalitu oocytů (Billard a kol., 1984; Gillet a kol., 1996). **Z tohoto důvodu nepřekračujeme jednorázovou injikovanou dávku GnRHa nad  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  jikernaček.** Tato teorie nepřímo navazuje na tvrzení Mylonase a kol. (1992), že hormonální zásah může vést k jemné asynchronii mezi dvěma různými procesy finálního stadia reprodukčního cyklu, finálního meiotického dozrávání oocytů a ovulace. Tato asynchronie může být posílena příliš vysokými hladinami LH, jejichž výše a intenzita se může navíc lišit v důsledku rozdílného fyziologického stavu jednotlivých jikernaček v okamžiku aplikace GnRHa (Gillet a kol., 1996). Výsledkem pak může být, že hormonálně ošetřené jikernačky někdy produkují jikry vysoké kvality a jindy zase velmi nízké. Tento fakt se však vyskytuje i u generačních hejn vytíraných bez hormonální stimulace. V našich pokusech se navíc nikdy nepodařilo prokázat souvislost mezi dávkou hormonu a kvalitou jiker. Do jaké míry tedy může dávka GnRHa ovlivnit schopnost oplození a životaschopnost jiker není známo.

---

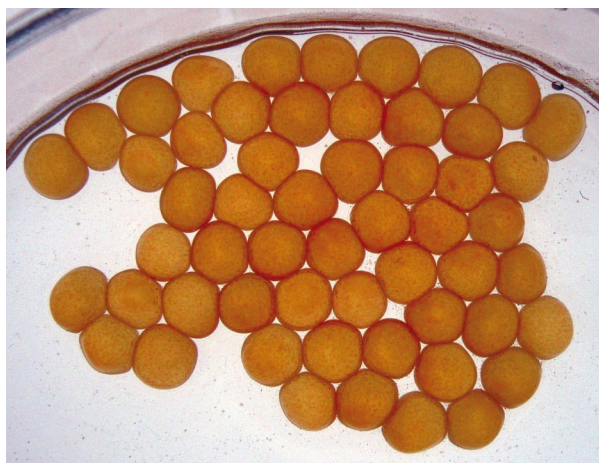
### 2.8.2. Zralost jiker

---

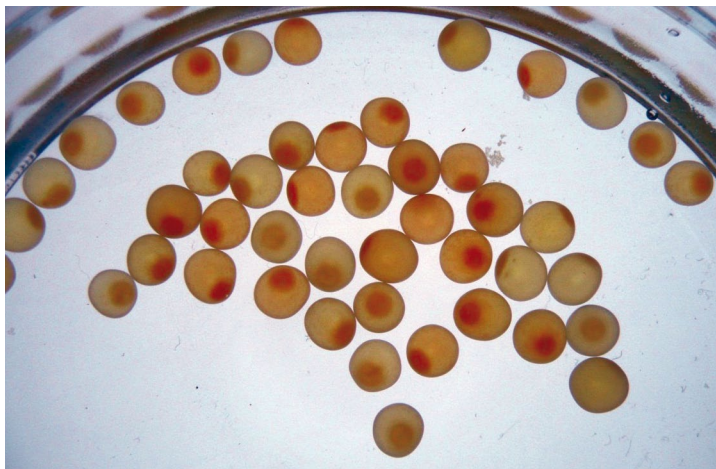
Springate a kol. (1984) a Kallert (2009) popisují, že jikry pstruha duhového vytřené cca 4–10 dní po ovulaci konzistentně dosahují vysokých hodnot oplozenosti a přežití do očních bodů. V umělých podmínkách pstružích líhní jsou oocyty lososovitých ryb ovulovány a zůstávají v dutině břišní, dokud nejsou vytřeny. Během této periody oocyty prodělávají proces zrání (Bromage a kol., 1992b; obr. 21), včetně meiotického zrání, které nemusí být po určitý čas po ovulaci ukončeno (Nagahama, 1983). Tudíž jako mohou být jikernačky v rozdílném fyziologickém stavu v okamžiku aplikace GnRHa, stejně tak mohou být jikry v okamžiku umělého výtěru v rozdílném stavu zralosti, což může vést k vytření neúplně zralých jiker bez ohledu na hormonální zásah (Švinger

a kol., 2012a). V průběhu experimentů se snažíme jikernačky kontrolovat velmi často, abychom co nejdříve zachytili průběh ovulace po hormonální stimulaci. Redukce kvality jiker je tedy dosti pravděpodobně výsledkem vlastní metodiky v experimentech s nerespektováním skutečnosti, že u lososovitých ryb dochází k zralosti jiker velmi postupně po ovulaci a proto není nutné spěchat s výtěrem.

U jikernaček pstruha duhového vytřených později po GnRHa aplikaci, tzn. 15–18. den na místo desátého dne k žádnému negativnímu ovlivnění zralosti jiker nedošlo. Tato teorie je podpořena záznamy z praxe starých severoamerických pstruhařů, kteří po kontrole generačního hejna ovulující jikernačky lososů vraceli „na dozrání“ na další 1 až 2 dny zpět do žlabů (Leitritz, 1969). Využití této metody se nám osvědčilo u pstruha obecného f. jezerní. Ovulace byla zaznamenána standardně 9. den po injikaci GnRHa. Jikernačky však byly vytřeny až o tři dny později s téměř 100% oplozeností (obr. 18 a 19). U jikernaček vytřených ihned po identifikaci ovulace byla oplozenost cca o 5–10% nižší. Doporučené termíny výtěrů po aplikaci GnRHa jsou uvedeny v tabulce 1.



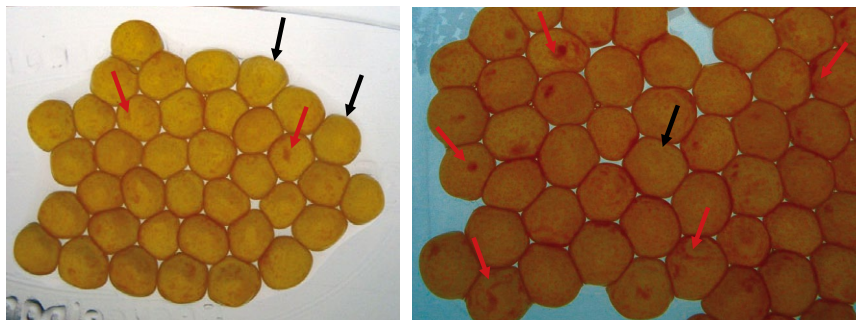
**Obr. 18.** Směsný vzorek čerstvě vytřených jiker pstruha obecného f. jezerní pocházející od jikernaček vytřených 3 dny po ovulaci. Na první pohled se jedná o jikry vysoké kvality, které nevykazují žádné známky vločkovitých struktur ani nerovnoměrného rozdělení tukových kapek (podkapitola 2.8.2.1.). Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



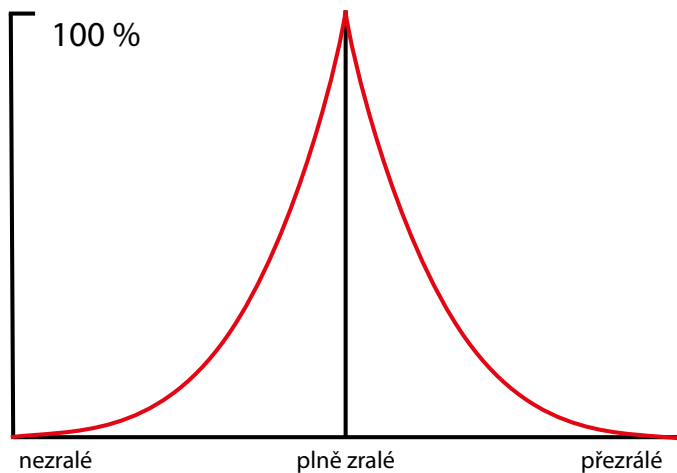
**Obr. 19.** Jikry pstruha obecného f. jezerní 7 dní po oplození (vzorek totožných jiker z obrázku 22). Odebrané vzorky vykazovaly 100% oplozenost. Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.

#### 2.8.2.1. Kontrola zralosti jiker

Kontrolu zralosti jiker musíme u salmonidů provádět bez ohledu na to, jestli hormonální stimulaci provádíme či ne. Pro jednoduchou a rychlou kontrolu zralosti jiker použijeme lupu a prosvětlovací desku. Při vlastním výtěru od každé jikernačky odebereme cca 10–20 ks jiker, které umístíme do průhledné nádoby (umělohmotné krabičky či petriho misky) a položíme ideálně na prosvětlovací desku se spodním světlem. Neklamným důkazem přezrálých jiker jsou drobné vločkovité struktury ve žloutku a silně nerovnoměrné rozdělení tukových kapének (Kallert, 2009; 2012a,b) (obr. 20). Takové jikry pro účely oplození použijeme jen v případě nedostatku jiker a oplození provádíme odděleně od optimálně zralých jiker. Proto vytíráme každou jikernačku do zvláštní misky. Společně s kontrolou zralosti jiker doporučujeme provést rovněž kontrolu kvality mlíčí dle metodiky Linharta a kol. (2011).



**Obr. 20.** Jikry pstruha obecného *f. potoční* (vlevo) vykazující známky počínající přezrállosti. Červené šipky upozorňují na vytvářející se vločkovité struktury (tmavé body) ve žloutku jiker. U takto vyhlížejících jiker lze očekávat nepatrné snížení oplozenosti (o 5–10 %). Lze je ještě oplozovat společně s jikrami vyhlížejícími jako na obrázku 22. Černé šipky upozorňují na jikry bez známek přezrání. Vpravo jsou vyobrazeny silně přezrálé jikry pstruha obecného *f. potoční*. Červené šipky upozorňují na výrazné vločkovité struktury ve žloutku jiker. Takové jikry je nutné oplodnit a inkubovat zvlášť. Dají se očekávat problémy s oplozeností a líhivostí (snížení o 50–90 %), ale zrovna tak i s vysokým stupněm deformovaného váčkového plůdka. Foto: Viktor Švinger a Dennis Kallert.



**Obr. 21.** Zrání jiker salmonidů po ovulaci dle Leitritze (1969).



### 2.8.3. Druhá příslušnost

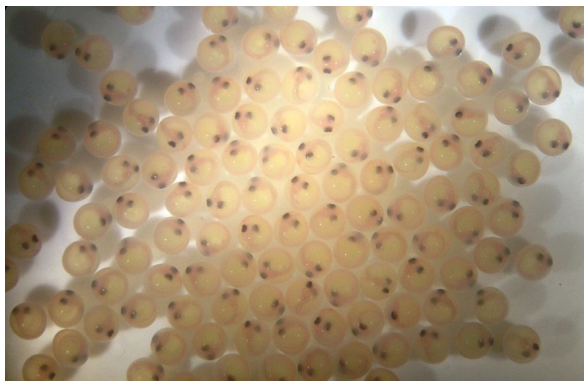
---

Jikry sivena amerického (obr. 22) po hormonálním zásahu vždy dosahují lepšího přežití (o 3–35%) v porovnání s jikrami od hormonálně neošetřených jikernaček, zatímco u pstruha duhového a síha peledě je jejich životaschopnost nezměněna nebo horší (většinou do 10%). Jsou-li tyto rozdíly opravdu výsledkem druhové příslušnosti, však nelze s jistotou tvrdit.

### 2.8.4. Morfologické charakteristiky jiker

---

Ve všech našich pokusech byly jikry menší a následně i váčkový plůdek lehčí, pokud jikry pocházely od hormonálně ošetřených jikernaček. (Švinger a kol., 2012a,b,c,d). O tom, že hormonální stimulace ovulace měla vliv na velikost vytřených jiker salmonidů, můžeme najít dva další záznamy, a to u lososa čavyči (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Olito a kol., 2001) a lososa kisuče (Donaldson a kol., 1981). V žádném případě však nebyl nalezen vztah mezi velikostí jiker a jejich životaschopností. Menší velikost je rovněž typická pro jikry pstruha duhového pocházející z posunutého letního termínu výtěru pomocí fotostimulace (Bromage a kol., 1992b). Podle našeho názoru zmenšení jiker způsobilo zkrácení finálních stadií vitelogeneze, jelikož hormonálním zásahem vždy dojde k nepatrnému urychlení ovulace.



**Obr. 22.** Vysoce kvalitní jikry sivena amerického v očních bodech pocházející od jikernačky, u které byl výtěr urychlen cca o 3 týdny (Litomyšl, Česká republika). Foto: Viktor Švinger a Jan Kouřil.

## 2.9. Zdravotní stav hormonálně ošetřených jikernaček v povýtěrovém období

Po injekci GnRH<sub>a</sub> či GnRH<sub>a</sub>-FIA ani v jednom případě nebyla zaznamenána zvýšená mortalita či negativní efekt na zdraví generačních ryb v povýtěrovém období. Pokusy se synchronizovanou ovulací jsme provedli u sivena amerického, síha peledě, pstruha duhového, lipana arktického, lipana podhorního a u obou anadromně nemigrujících forem pstruha obecného (jezerní a potoční). Po pitvě v dutině břišní a v místě vpichu nebyly nalezeny žádné známky zánětů, hematomů či puchýřů. Na základě našich výsledků GnRH<sub>a</sub> a ani FIA nepředstavují žádné zdravotní nebezpečí pro generační ryby.

## 2.10. Doporučovaná hormonálně řízená reprodukce vybraných druhů salmonidů

### 2.10.1. Siven americký

S hormonálním zásahem u generačního hejna sivena amerického v ČR lze začít již 1,5 měsíce před obdobím hlavního výtěrového období. Výtěrová sezóna sivena amerického trvá od poloviny října tři týdny až 1,5 měsíce. Pro docílení maximálního synchronizačního účinku je vhodné provádět hormonální zásah (tab. 1) po snížení podzimních teplot vody na 6–7 °C. Uvedené metody spolehlivě fungují při teplotách do 10 °C. Jejich účinnost při vyšších teplotách nebyla testována. Výše popsané hormonální zásahy jsou rovněž velmi účinné při nutnosti urychlení ovulace v případě masivního výskytu saprolegniózy, která je u sivena amerického velmi častým jevem v konečném období reprodukčního cyklu a je doprovázena vysokými úhyny.

#### Stimulace s postupným uvolňováním GnRH<sub>a</sub>

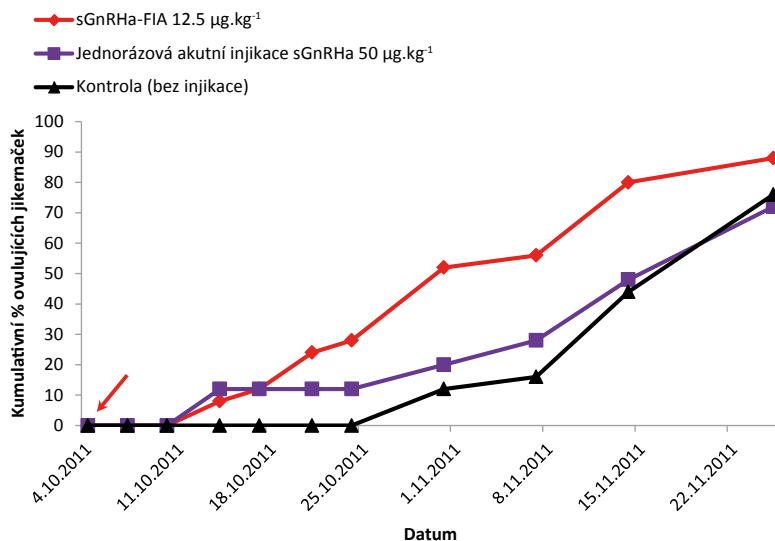
Aplikace [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub>-FIA v dávce 20–25 µg.kg<sup>-1</sup> je velmi účinná. 14–15 dní po aplikaci je vytřeno většinou 100 % jikernaček. Přípravek Ovaplant® nelze doporučit, a to vzhledem k malé velikosti generačních sivenů.

#### Okamžitá stimulace

Okamžitá jednorázová dávka 25–50 µg.kg<sup>-1</sup> [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> vyvolá ovulaci v rozmezí asi 10–50 %, je-li podána 2–4 týdny před hlavní výtěrovou sezónou. Její účinnost se zvyšuje s přibližováním přirozeného data výtěru a snižující se teplotou. Nicméně vzhledem k výsledkům zobrazeným v grafu 2 ji nelze doporučit. Vysoce účinná je dvojitá dávka dle tab. 1.

**Tab. 1.** Souhrn účinných otestovaných hormonálních zásahů u sedmi druhů salmonidů.

Metoda		Teplota	Dávka		Interval latence (dny po 1. injikaci)		Termin výtěru (dny po 1. injikaci)		
			Postupné uvolňování (GnRH-a, FIA nebo Oviplant <sup>®</sup> )	Jednorázová okamžitá (akutní)	Postupné uvolňování (GnRH-a, FIA nebo Oviplant <sup>®</sup> )	Jednorázová okamžitá (akutní)	Postupné uvolňování (GnRH-a, FIA nebo Oviplant <sup>®</sup> )	Jednorázová okamžitá (akutní)	
Druh	Přípravek/analog		D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET	Dvojitá okamžitá (akutní)	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET				
	<b>Siven americký</b>	6-7 °C	20-25 µg.kg <sup>-1</sup>	25-50 µg.kg <sup>-1</sup> , nedoporučuje se, účinná pouze z 10-50% dnů	2 × 25 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2-3 dnů	9	8-9	14-15	13-14
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			nedoporučuje se	nedoporučuje se				
	<b>Pstruh duhový</b>	7-10 C	Oviplant <sup>®</sup> 25 µg.kg <sup>-1</sup>			10		16-20	
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			nedoporučuje se	nedoporučuje se				
	<b>Pstruh obecný f. jezerní</b>	6-8 °C	netestováno		D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET 2 × 25 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2 dnů		9		12-14
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			nedoporučuje se	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET 2 × 25 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2 dnů	6-8 dní – aplikace provedena cca týden před přirozeným výtěrem, jinak 9		10-11 při intervalu latence 6-8	
	<b>Pstruh obecný f. potoční</b>	6-8 °C	15-30 µg.kg <sup>-1</sup>	nedoporučuje se	2 × 25 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2 dnů		9	13-14 při intervalu latence 9	13-14
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			nedoporučuje se	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET Supergestran 2 × 10-25 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2-3 dnů	12-13	12-13	16-18	15-16
	<b>Sih peled'</b>	< 3 °C	25 µg.kg <sup>-1</sup>	25 µg.kg <sup>-1</sup> , doporučuje se pouze při teplotě < 2 °C					
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			Supergestran	Supergestran				
	<b>Lipán podhorní</b>	6-8 °C	15-20 µg.kg <sup>-1</sup>	25 µg.kg <sup>-1</sup> , pouze těsně před přirozeným termínem ovulace	2 × 10 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2 dnů	8-9	6	11-12	7-8
Přípravek/analog	D-Arg <sup>6</sup> Pro <sup>9</sup> -NET			Supergestran	Supergestran				
	<b>Lipán arktický</b>	4-7 °C	netestováno	neúčinná	2 × 10 µg.kg <sup>-1</sup> s odstupem 2 dnů		10-11		12-13



**Graf 2.** Průběh ovulace v čase v závislosti na provedených hormonálních zásazích u sivena amerického pomocí [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NEt]-sGnRHa podaného v dávce 12,5 µg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti ve formě sGnRHa-FIA a akutní jednorázové dávce 50 µg.kg<sup>-1</sup>. Tento graf demonstruje vyšší účinnost čtyřnásobně nižší dávky sGnRHa podané metodou postupného uvolňování. Kontrola je bez hormonálního ošetření. Červená šipka indikuje den provedení stimulace.

## 2.10.2. Pstruh duhový

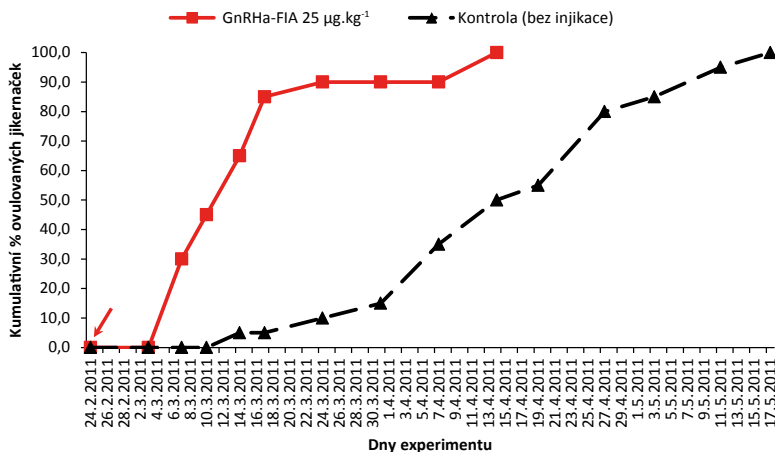
Výtěrová sezóna jednotlivých plemen a populací pstruha duhového (s jarním či podzimním výtěrem) může být roztažena do období delšího než 3 měsíce. Vzhledem k její délce je vhodné začít s hormonální stimulací přibližně na jejím začátku s výskytem první ovulující jikernačky (kapitola 2.7.).

### Stimulace s postupným uvolňováním GnRHa

Na pstruhařském objektu Nedošín Rybářství Litomyšl s.r.o. byla provedena synchronizace výtěrů pstruha duhového s jarní výtěrovou sezónou od konce února až do konce května (graf 3). Jako nejvhodnější se ukázala protrahovaná hormonální stimulace za využití [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NEt]-sGnRHa-FIA v dávce 25 µg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti (tab. 1). S vlastními výtěry doporučujeme začít za 16–20 dní po aplikaci sGnRHa-FIA při teplotě 7–10°C. U těžších generačních ryb > 7 kg lze doporučit přípravek Ovaplant<sup>®</sup> v balení 150 µg [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NEt]-sGnRHa/peleta (kapitola 2.6.4.).

## Okamžitá stimulace

U podobných plemen pstruha duhového s takto dlouhou přirozenou délkou výtěrové sezóny jako v grafu 3 nedoporučujeme využívat akutní hormonální zásahy.



**Graf 3.** Průběh ovulace v čase u pstruha duhového s jarním obdobím výtěrové sezóny. 22 dní po hormonálním zásahu bylo v experimentální skupině vytěno téměř 90% jikernaček, zatímco výtěr v kontrolní skupině byl ukončen až začátkem druhé poloviny května. Hormonální zásah byl proveden při postupně stoupající teplotě 7–8 °C. Kontrola je bez hormonálního ošetření. Červená šipka indikuje den provedení stimulace.

### 2.10.3. Síň peled'

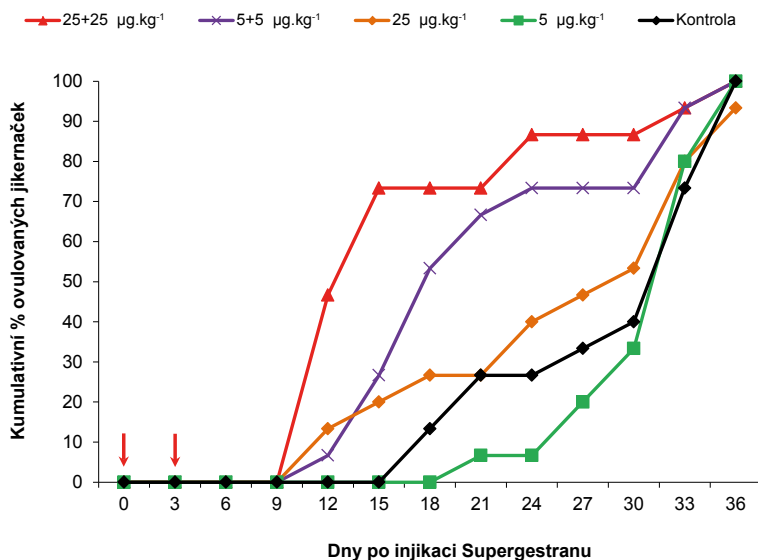
S hormonálním zásahem u generačního hejna síňa peledě lze začít cca 1 měsíc (konec listopadu, začátek prosince) před nástupem hlavního výtěrového období, které může trvat 2 týdny až 1 měsíc. Pro docílení maximálního synchronizačního účinku je vhodné počkat do poklesu zimních teplot vody pod 2 °C.

#### Stimulace s postupným uvolňováním GnRHα

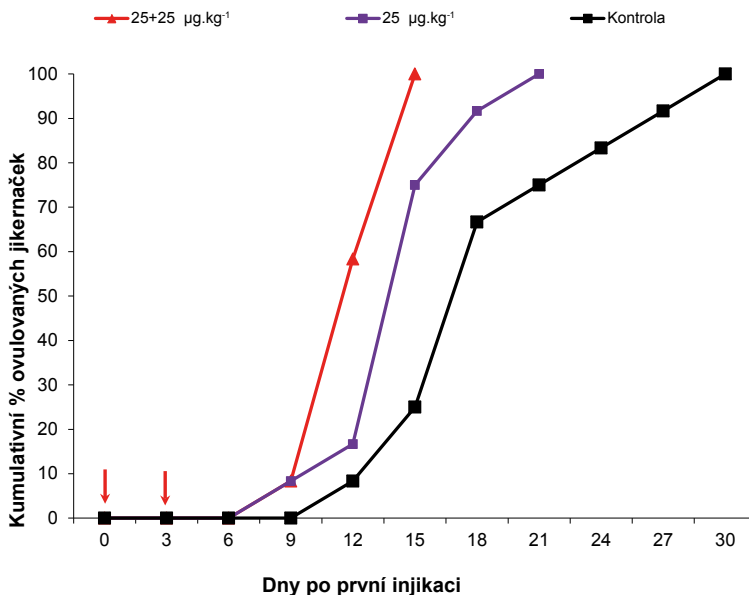
V druhé polovině listopadu a při vyšší teplotě (> 4,5 °C) lze synchronizaci ovulace indukovat pomocí [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NEt]-sGnRHα-FIA v dávce 25 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH s termínem výtěru uvedeném v tab. 1. Přípravek Ovaplant® nelze doporučit, a to vzhledem k malé velikosti generačních síňů.

### Okamžitá stimulace

V případě teplot  $< 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  v první dekádě prosince je funkční i jednorázová akutní dávka  $25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRHa (tab. 1, graf 5). Velmi účinným zásahem je dvojitá akutní aplikace [D-Tle<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-mGnRHa v přípravku Supergestran® v dávce  $5\text{--}25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  živé hmotnosti jikernaček (ŽH), která funguje i při teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (graf 4). Ve velké většině 15. den ovuluje 100% injikovaných jikernaček. S výtěry lze započít 16–18. den po injikaci GnRHa. Při dvojnásobné dávce  $5\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH [D-Tle<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-mGnRHa v přípravku Supergestran® s výtěry začínáme až 21. den po první injikaci. Jednorázová injekce přípravku Supergestran® je u síha peledě při vyšších teplotách neúčinná.



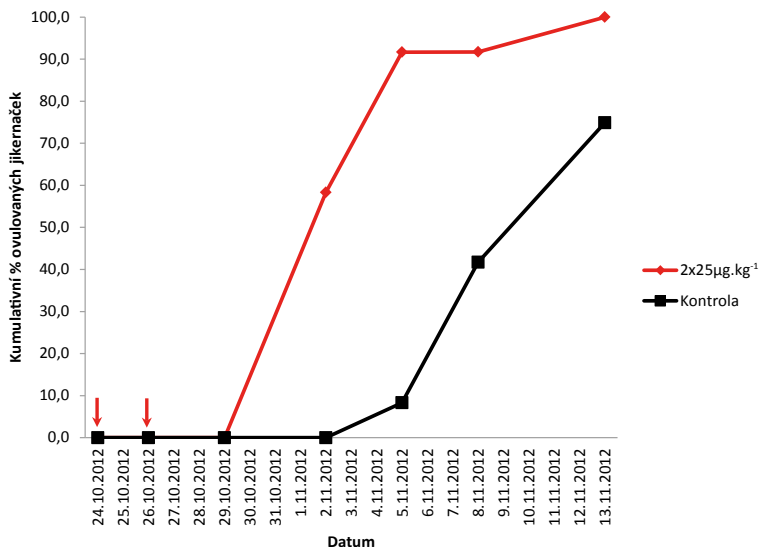
**Graf 4.** Průběh ovulace u jikernaček síha peledě, které byly okamžitě stimulovány přípravkem Supergestran® při teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5. 12. 2009). Na grafu je jasně patrné, že dvojitá injikace 3 dny po sobě v dávce  $5\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH je daleko efektivnější, než jednorázová dávka  $25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Červené šipky indikují dny provedení hormonální stimulace. Kontrola je bez hormonálního ošetření.



**Graf 5.** Průběh ovulace u jikernaček sílha peledě, které byly okamžitě stimulovány analogem [D-Arg6-Pro9NET]-sGnRHa při teplotě vody 0,4 °C (5. 12. 2010). Jednorázová okamžitá injekce sGnRHa v dávce 25 µg.kg<sup>-1</sup> je v tomto případě daleko efektivnější než shodná dávka mGnRHa v roce 2009 (graf 4). Tento rozdíl je patrně způsoben teplotou 4,6 °C při aplikaci, než účinností různých molekul GnRHa. Červené šipky indikují dny provedení hormonální stimulace. Kontrola je bez hormonálního ošetření. Převzato z Švinger a kol. (2012a).

#### 2.10.4. Pstruh obecný f. jezerní

S hormonální stimulací lze začít přibližně 1 měsíc před hlavní výtěrovou sezónou (konec října až konec listopadu), která trvá 1–2 měsíce. Velmi účinným zásahem je dvojitá akutní aplikace [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRHa v dávce 25 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH, která zkracuje a synchronizuje výtěrovou sezónu na 1–3 dny (graf 6). Ovulace u jikernaček nastává při teplotě 6–8 °C 9. den po první injekci hormonu. S výtěry je však nutno počkat do 12.–14. dne, což výrazně zvyšuje oplozenost jiker (kapitola 2.8.2.) a relativní plodnost jikernaček cca o 3 %.



**Graf 6.** Průběh ovulace u pstruha obecného f. jezerní (generační hejno Bodensee, Německo) po aplikaci dvojité okamžitě stimulující dávky sGnRH $\alpha$ . Kontrola je bez hormonálního ošetření. Červené šipky indikují den provedení stimulace.

### 2.10.5. Pstruh obecný f. potoční

S hormonálním zásahem u pstruha obecného lze začít již 1,5–1 měsíc před hlavním obdobím výtěrů (konec října, začátek listopadu). Výtěrová sezóna trvá v závislosti na populaci tři týdny až 4 měsíce od listopadu do února. U populací s dlouhou výtěrovou sezónou začínáme s injkací jako u pstruha duhového (kapitola 2.10.2.).

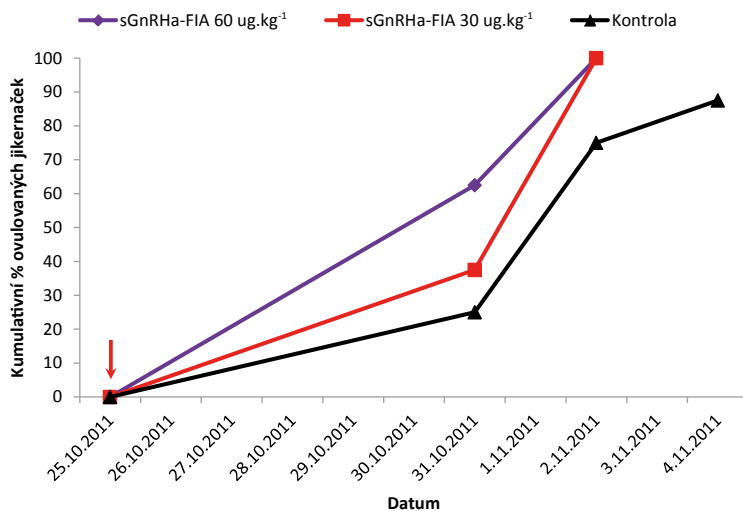
#### Stimulace s postupným uvolňováním GnRH $\alpha$

Jako velmi účinná se rovněž ukázala dávka 30 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH $\alpha$ -FIA podaná přibližně týden před výtěrovou sezónou (graf 7). Jelikož byla aplikace sGnRH $\alpha$ -FIA velmi blízko přirozenému termínu ovulace, došlo při teplotě 8 °C ke zkrácení intervalu latence na 6 dní a 100% ovulujících jikernaček bylo zaznamenáno 8. den po injkaci hormonu. V roce 2012 byla u stejného generačního hejna s úspěchem aplikována dávka s postupným účinkem, a to 15 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH $\alpha$ -FIA, což výrazně snižuje cenu zásahu. Dávka 60 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH u pstruha obecného f. potoční efektivitu zásahu nezvyšuje a vzhledem k její nákladovosti ji nelze doporučit.

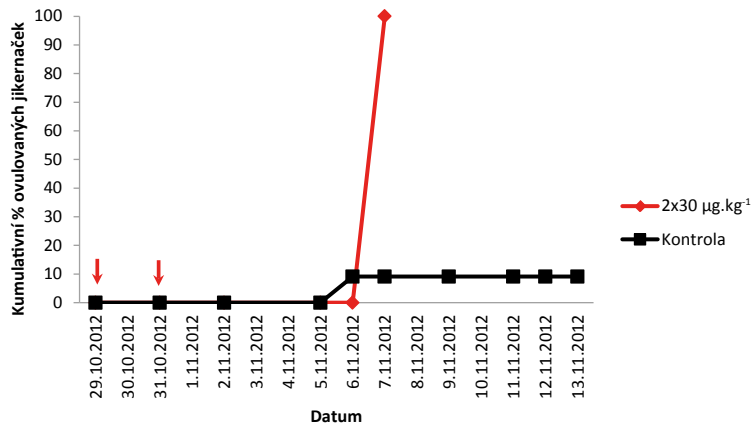


### Okamžitá stimulace

Velmi účinným zásahem je dvojitá akutní aplikace [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRH<sub>a</sub> v dávce 25–30 µg.kg<sup>-1</sup> ŽH, která zkracuje a synchronizuje výtěrovou sezónu na 1–3 dny (graf 8). Při uplatnění tohoto zásahu u 100 ks 5 letých jikernaček pstruha obecného f. potoční z řeky Main cca 14 dní před hlavním obdobím výtěrů ovulovalo 70 % jikernaček 10. den po aplikaci hormonu při teplotě 8 °C. O tři dni později bylo vytřeno 100 % jikernaček. V tomto případě ale doporučujeme se samotným výtěrem (obr. 23) začít až 13–14 den po první aplikaci hormonu.



**Graf 7.** Průběh ovulace u jikernaček pstruha obecného f. potoční s postupnou stimulací ryb injikovaných cca 1 týden před hlavním výtěrovým obdobím. Poslední jikernačka v kontrole uhynula na saprolegniózu před dosažením ovulace a nebyla vytřena. Kontrola je bez hormonálního ošetření. Červená šipka indikuje den provedení stimulace.



**Graf 8.** Efekt dvojité akutní aplikace [D-Arg<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET]-sGnRHa na synchronizaci ovulace pstruha obecného f. potoční (řeka Main, Německo). Pstruh obecný se v tomto povodí vytírá v období od začátku listopadu do konce února. Synchronizace ovulace v tomto případě znamená značnou úsporu práce. Červené šipky indikují dny provedení hormonální stimulace. Kontrola je bez hormonálního ošetření.



**Obr. 23.** Vytěr jikernačky pstruha obecného f. potoční (povodí řeky Main, Německo). Foto: Viktor Švinger a Günther Taschner.

### 2.10.6. Lipan arktický a lipan podhorní

---

U obou druhů lze začít s hormonální stimulací přibližně 1 měsíc před hlavní výtěrovou sezónou (začátek května u lipana arktického, březen až začátek dubna u lipana podhorního).

U sibiřského lipana arktického byla účinná dvojitá injekce přípravku Supergestran® v dávce  $10\text{--}25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  [ $\text{D-Tle}^6\text{-Pro}^9\text{NET}$ ]-mGnRHa ŽH při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (asi  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pod optimem výtěrové teploty lipana arktického na Sibiři). Jednorázová dávka  $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH mGnRHa nebyla za těchto podmínek účinná. Interval latence při teplotě  $4\text{--}7 \text{ }^\circ\text{C}$  je při dvojitě dávce  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH 11 dní a při dvojitě dávce  $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH 10 dní (Švinger a kol., 2012c). Optimální začátek výtěrů je vhodné posunout na 12.–13. den po aplikaci hormonu.

U lipana podhorního je velmi účinnou metodou indukce ovulace aplikace [ $\text{D-Arg}^6\text{-Pro}^9\text{NET}$ ]-sGnRHa-FIA v dávce  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH. Při teplotě  $9 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo k výtěru 100% jikernaček 10. den po aplikaci hormonu. Kouřil a kol. (1987) s úspěchem indukovali ovulaci pomocí jednorázové akutní dávky  $10\text{--}40 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH  $\text{D-Ala}^6\text{-Pro}^9\text{NET-GnRHa}$ . K podobným výsledkům došel Mikolajczyk a kol. (2008) při použití  $16\text{--}48 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ŽH  $\text{D-Nal(2)}^6\text{-Pro}^9\text{-[aza-Gly]-GnRHa}$  v přípravku Gonazon™ při teplotě  $6\text{--}7 \text{ }^\circ\text{C}$  a intervalu latence 3–6 dní.

---

### 2.11. Závěr

---

Použití výše popsaných metod je a bude využíváno ve spolupráci s pstružími líhněmi, farmami a vědeckými institucemi jak v ČR, tak v zahraničí především v souvislosti s precizní kontrolou reprodukčního cyklu salmonidů, optimalizací produkce jiker a pracovních postupů. Vzhledem k občasným problémům s kvalitou jiker u hormonálně ošetřených jikernaček se další výzkum musí úzkostlivě zaměřit směrem k eliminaci těchto problémů hlavně u pstruha duhového.

### 3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předložená metodika shrnuje a rozšiřuje jak naše, tak i zahraniční doposud publikované vědecké práce o hormonální kontrole reprodukce a synchronizace ovulace lososovitých ryb, které vedly k sestavení této publikace. Tato metodika je unikátní v tom, že obsahuje zpracovaný přehled nejnovějších důležitých informací o endokrinologii salmonidů a postupech v jejich řízené reprodukci. Žádný jiný podobný materiál v českém jazyce doposud neexistuje.

### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodiku lze uplatnit ve všech podnicích, zařízeních a vědecko-výzkumných institucích zabývajících se reprodukcí lososovitých ryb a produkcí jejich jiker.

### 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Hlavní výhodou precizní kontroly a synchronizace ovulace u lososovitých je přesná predikce období výtěrů a jeho zkrácení do několika málo dnů. To dává managementu líhně možnost mnohem efektivnějšího plánování prací na líhních v období výtěrové sezóny. Současně je možné výtěr urychlit o přibližně 1 až 1,5 měsíce, což nabízí možnost produkce „raných“ jiker v očních bodech, či rozfázování produkce jiker na dvě či tři věkové sorty, což prodlužuje období nabídky jiker k prodeji. Tato fázovost dále usnadňuje celkovou kontrolu a péči o inkubované jikry na líhni. Nižší manipulace s jikernačkami redukuje riziko poranění a ztrát.

Podle propočtů provedených ve spolupráci s Rybářstvím Litomyšl s. r. o. urychlení a synchronizování ovulace generačního hejna jikernaček pstruha duhového (cca 350 ks, ~ 4 kg.ks<sup>-1</sup>) znamená značnou úsporu času (přibližně 20 000 Kč za výtěrovou sezónu delší než 3 měsíce). Nicméně riziko ztráty 10 % jiker do přežití očních bodů u raných jiker by mohlo zdražit jejich cenu až o 40 Kč za 1 000 jiker v očních bodech. Časná a synchronizovaná produkce jiker bez těchto ztrát musí počítat se zdražením jiker pouze o 3,50 Kč na 1 000 jiker.

U generačního sivena amerického (300 ks, ~1,5 kg.ks<sup>-1</sup>) po opakovaných pokusech byla kvalita jiker hormonálně ošetřených jikernaček někdy až o 35 % lepší (většinou však o 3–10 %) ve srovnání s jikernačkami, které ovulovaly přirozeně. Při možných problémech se saprolegniózou se dá očekávat, že množství vytřených jikernaček s hormonální stimulací bude rovněž o cca 10 % vyšší (graf 2). Tento fakt s přičtením úspory na pracovní dobu a odečtením nákladů na hormonální zásah představuje úsporu až 21 000 Kč na generační hejno o velikosti 300 ks. V evropských zemích s dražší pracovní silou (např. Německo, Norsko, Dánsko) jsou úspory mnohem výraznější.

Do budoucna plánujeme snížení ceny hormonálního zásahu přibližně o 30–50 % a vyřešení problému občasného snížení kvality jiker, které se zdá být spíše problémem metodiky vlastních vědeckých experimentů, než hormonálního zásahu ve snaze zachytit co nejpřesněji průběh ovulací daného generačního hejna po hormonální aplikaci (kapitola 2.6.). Další pokusy by tento problém měly zcela eliminovat.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Amano, M., 2010. Reproductive biology of salmoniform and pleuronectiform fishes with special reference to gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Aqua-BioScience Monographs 3: 39–72.
- Ando, H., Swanson, P., Kitani, T., Koide, N., Okada, H., Ueda, H., Urano, A., 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 $\beta$  on gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells *in vitro*. General and Comparative Endocrinology 137: 109–121.
- Arabaci, M., Diler, I., Sari, M., 2004. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRH $\alpha$ ) and its effects on egg quality. Aquaculture 237: 475–484.
- Billard, R., Reinaud, P., Hollebecq, M. G., Breton, B., 1984. Advancement and synchronization of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-A combined or not with pimozide. Aquaculture 43: 57–66.
- Bradley, J.A., Goetz, F.W., 1994. The inhibitory effects of indomethacin, nordihydroguaiaretic acid and pyrrolidinedithiocarbamate on ovulation and prostaglandin synthesis in yellow perch (*Perca flavescens*): effects of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. General and Comparative Endocrinology 75: 454–465.
- Breton, B., Weil, C., Sambroni E., Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRH on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 91: 373–383.
- Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T., 1998. GTH-I and GTH-II secretion profiles during the reproductive cycle in females rainbow trout: Relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. General and Comparative Endocrinology 111: 38–50.
- Bromage, N. R., Whitehead, C., Breton, B., 1982. Relationships between serum levels of gonadotropin, oestradiol-17 $\beta$ , and vitellogenin in the control of ovarian development in the rainbow trout: II. The effects of alterations in environmental photoperiod. General and Comparative Endocrinology 47: 366–376.
- Bromage, N. R., Cumaranatunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout In: Muir J.F., Roberts, R.J. (Eds), Recent Advances in Aquaculture, vol. III. Croom Helm, London, United Kingdom: 63–138.

- Bromage, N., Randall, C., Davies, B., McAndrew, B., 1992a. The control of reproduction in salmonid fish. *Icelandic Agricultural Sciences* 6: 11–23.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992b. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141–166.
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J., 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: a case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology* 67: 786–794.
- Carolsfeld, J., Sherwood, N.M., Kreiberg, H., Sower, S.A. 1988. Induced sexual maturation of herring using GnRHa “quick-release” cholesterol pellets. *Aquaculture* 70: 169–181.
- Crim, L.W., Evans, D.M., Vickery, B.H. 1983a. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LH-RH analogues administered at various stages of gonadal development. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 61–67.
- Crim, L.W., Sutterlin, A.N., Evans, D.M., Weil, C., 1983b. Accelerated ovulation by pelleted LH-RH analogue treatment of spring spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperature. *Aquaculture* 35: 299–307.
- Crim, L.W., Nestor, J.J., Wilson, C.E., 1988. Studies of the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. *General and Comparative Endocrinology* 71: 372–382.
- Donaldson, E.M., Hunter, G.A., Dye, H.M., 1981. Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II. Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. *Aquaculture* 26: 129–141.
- Fjellidal, P.G., Hansen, T., Huang, T., 2011. Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 321: 93–100.
- Forniés, M.A., Carrillo, M., Mañanós, E., Sorbera, L.A., Zohar, Y., Zanuy, S., 2003. Relative potency of the forms of GnRH and their analogs on LH release in sea bass. *Journal of Fish Biology* 63: 73–89.
- Gillet, C., 1991. Egg production in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) broodstock: effects of temperature on the timing of spawning and the quality of eggs. *Aquatic Living Resources* 4: 109–116.
- Gillet, C., Breton, B., Mikolajczyk, T., 1996. Effects of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 °C. *Aquatic Living Resources* 9: 257–263.
- Gillet, C., Breton, B., 2009. LH secretion and ovulation following exposure of Arctic charr to different temperature and photoperiod regimes: Responsiveness of females to

- a gonadotropin-releasing hormone analogue and a dopamine antagonist. *General and Comparative Endocrinology* 162: 210–218.
- Gillet, C., Breton, B., Mikolajczyk, T., Bodinier, B., Fostier, A., 2011. Disruption of the secretion and action of 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in response to a rise in temperature in the Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Consequences on oocyte maturation and ovulation. *General and Comparative Endocrinology* 172: 392–399.
- Goetz, F.W., Garczynski, M., 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 33–38.
- Guy, B., 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews (Microbiology)* 5: 505–517.
- Haraldsson, H., Sveinsson, T., Skúlason, S., 1994. Effects of LHRHa treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 145–150.
- Hokanson, K.E.F., McCormick, H., Jones, B.R., Tucker, J.H. 1973. Thermal requirements for maturation, spawning, and embryo survival of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 30: 975–984.
- Hyllner, S.J., Haux, C., 1995. Vitelline envelope proteins in teleost fish. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds), *Reproductive Physiology of Fish*, Fish Symposium 95, Austin, USA, pp. 331–335.
- Johnson, L., 1980. The Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. In: Balon, E.K. (Ed.), *Charrs, Salmonid Fishes of the Genus Salvelinus*. Dr. W. Junk B.V. Publishers, The Hague, The Netherlands, pp. 15–98.
- Johnston, G., 2002. *Arctic Charr Aquaculture*, Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 265 pp.
- Jungwirth, M., 1979. Ovulation inducement in prespawning adult danube salmon (*Hucho hucho*, L.) by injection of acetone-dried carp pituitary (CP). *Aquaculture* 17: 129–135.
- Kallert, D.M., 2009. Der Einfluss exogener und endogener Parameter auf den Erbrütungserfolg bei Salmoniden: Eine integrative Untersuchung von Problemen bei der Vermehrung von Bachforelle, Bachsaibling und Seesaibling. Bezirk Oberfranken, Bayreuth 2009, Deutschland, 144 pp. [http://www.bezirk-oberfranken.de/fileadmin/5\\_Natur/fischerei/publikationen/AB\\_Kallert\\_Endfassung.pdf](http://www.bezirk-oberfranken.de/fileadmin/5_Natur/fischerei/publikationen/AB_Kallert_Endfassung.pdf)
- Kallert, D.M., 2012a. Qualitätsparameter bei Rogen und Milch von Salmoniden: Was sagt die Wissenschaft? *Fischer und Teichwirt* 06/2012: 216–218.
- Kallert, D. M., 2012b. Was kann über Erfolg oder Misserfolg bei der Salmonidenvermehrung entscheiden? *Fischer und Teichwirt* 08/2012: 292–294.
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 114, 26 s.

- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y., Itoh, S., 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 29–38.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 2003. Ovarian growth and plasma sex steroid and vitellogenin profiles during vitellogenesis in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 219: 797–813.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., Watts, M., Pankhurst, P.M., 2003. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 63: 153–167.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 2004a. Effect of maintenance at elevated temperatures on ovulation and luteinizing hormone releasing hormone analogue responsiveness of female Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Tasmania. *Aquaculture* 233: 583–597.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 2004b. Effect of short-term temperature reduction on ovulation and LHRHa responsiveness in female Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained at elevated water temperatures. *Aquaculture* 238: 421–436.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 2007. Additive effects of advanced temperature and photoperiod regimes and LHRHa injection on ovulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 273: 729–738.
- Kråkenes, R., Hansen, T., Stefansson, S.O., Taranger, G.L., 1991. Continuous light increases growth rate of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) postsmolts in sea cages. *Aquaculture* 95: 281–287.
- Leitritz, E., 1969. Die Praxis der Forellenzucht. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, Germany, 119 pp.
- Mayer, L., 2001. Seesaiblinge (*Salvelinus alpinus*) – Vermehrung, Aufzucht und Produktion in der Teichwirtschaft – Altbekanntes, Offensichtliches und Neues. *Fischer und Teichwirt* 9, 330–331.
- Mayer, I., Schmitz, M., Borg, B., Schulz, R., 1992. Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone, and 17 $\beta$ -estradiol. *Canadian Journal of Zoology* 70: 37–42.
- Mikolajczyk, T., Skolowska-Mikolajczyk, M., Szczerbik, P., Duc, M., Goryczko, K., Dobosz, S., Glogowski, J., Epler, P., Enright, W.J., 2008. The effects of the GnRH agonist, azaglynafarelin (Gonazon™), on ovulation and egg viability in the European grayling (*Thymallus thymallus* L.). *Aquaculture* 281: 126–130.
- Mylonas, C.C., Hinshaw, J.M., Sullivan, C.V., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106: 379–392.



- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 463–491.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of the teleost gonads In: Hoar, W.S., Randal, D. J., Donaldson, E.M. (Eds), *Fish Physiology*, Vol. IX, Part A, Academic Press, New York, USA, pp. 223–275.
- Nagahama, Y., 1997.  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190–196.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T., 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology* 30: 103–145.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., Katsu, Y., 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology* 30: 103–145.
- Nordgarden, U., Hansen, T., Hemre, G.I., Sundby, A., Björnsson, B.T., 2005. Endocrine growth regulation of adult Atlantic salmon in seawater: the effects of light regime on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I and insulin levels. *Aquaculture* 250: 862–871.
- Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M., Takahashi, T., 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8442–8447.
- Oka, Y., 1997. GnRH neuronal system of fish brain as a model system for the study of peptidergic neuromodulation In: Parhar, I.S., Sakuma, Y. (Eds), *GnRH Neurons: Gene to behavior*. Brain Shuppan Publishers, Tokyo, Japan, pp. 245–276.
- Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica* 193: 3–15.
- Okuzawa, K., Amano, M., Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I., Hasegawa, Y., Miyamoto, K., 1990. Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *General and Comparative Endocrinology* 80: 116–126.
- Olito, C., Loopstra, D., Hansen, P., 2001. Acceleration of sexual maturation in chinook salmon broodstock using luteinizing hormone-releasing hormone analog. *North American Journal of Aquaculture* 63: 208–214.
- Pankhurst, N.W., Carragher, J.F., 1991. Seasonal endocrine cycles in marine teleosts In: Scott, A. P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds), *Reproductive Physiology of Fish*, Fish-Symp 91, Sheffield, United Kingdom, pp. 131–135.

- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P. M., Forteach, G.N.R., 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovaria steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146: 277–290.
- Pankhurst, N.W., Thomas, P.M., 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture* 166: 166–177.
- Pankhurst, N.W., King, H.R., 2010. Temperature and salmonid reproduction: implications for aquaculture. *Journal of Fish Biology* 76: 69–85.
- Park, W.D., Lee, Ch.H., Lee, Ch.S., Kim, D-J., Kim, J-H., Tamaru, C.S., Sohn, Y.Ch., 2007. Effects of gonadotropin-releasing hormone analog combined with pimozide on plasma sex steroid hormones, ovulation and egg quality in freshwater-exposed female chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture* 271: 488–497.
- Pasqualini, C., Vidal, B., Le Belle, N., Sbahi, M., Weltzien, F.A., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S., 2004. An antagonist to GnRH in the control of reproduction in teleost fish: dopaminergic inhibition. Ancestral origin and differential conservation within vertebrates? *Journal de la Société de Biologie* 198: 61–67.
- Porter, M.J.R., Duncan, N.J., Mitchell, D., Bromage, N.R., 1999. The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effects on the inhibition of grilising. *Aquaculture* 176: 237–244.
- Saunders, R.L., Henderson, E.B., Harmon, P.R., 1985. Effects of photoperiod on juvenile growth and smolting of Atlantic salmon and subsequent survival and growth in sea cages. *Aquaculture* 45: 55–66.
- Směrnice 2004/28/ES, 2004: Směrnice Evropského parlamentu a Rady ze dne 31. března 2004, kterou se mění směrnice 2001/82/ES o kodexu Společenství týkajícím se veterinárních léčivých přípravků – odstavec 17.
- Specker, J.L., Sullivan, C.V., 1994. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives In: Davey, K.G., Peter, E.E., Tobe, S.S. (Eds), Perspectives in Comparative Endocrinology, Nat. Res. Council. Can., Ottawa, Canada, pp. 304–315.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliot, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatching and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 43: 313–322.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Cumaranatunga, P.R.T., 1985. The effects of ration on fecundity and egg quality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) In: Cowey, C.B., Mackie, A. M., Bell, J.G. (Eds), Nutrition and Feeding in Fish, Academic Press, London, England, pp. 371–393.

- Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W. W., 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 169–176.
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2012a. Synchronization of ovulation in cultured northern whitefish (*Coregonus peled*, Gmelin 1788) using [D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net]-sGnRH analogue and its effect on egg quality. *Aquaculture Research*, DOI 10.1111/are.12025.
- Svinger, V.W., Policar, T., Steinbach, C., Polakova, S., Jankovych, A., Kouril, J., 2012b. Synchronization of ovulation in brook char (*Salvelinus fontinalis*, Mitchell 1814) using emulsified D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>NET sGnRH<sub>a</sub>. *Aquaculture International*, DOI 10.1007/s10499-012-9578-5. In press.
- Švinger, V. W., Hansen, T., Shadrin, Y., Policar, T., Kouril, J., 2012c. Induction and advancement of ovulation in wild Arctic grayling (*Thymallus arcticus arcticus*) using D-Tle<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>,NET-mGnRH<sub>a</sub> Lecirelin. *Czech Journal of Animal Science* 58: 8–14.
- Švinger, V.W., Kallert, D.M., Kouřil, J., 2012d. Changes in egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook char (*Salvelinus fontinalis*) after various treatments with D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>NET sGnRH<sub>a</sub>. Poster presentation, AQUA 2012, Prague, 1–5 September.
- Taranger, G.L., Stefansson, S.O., Hansen, T., 1992. Advancement and synchronization of ovulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following injections of LHRH analogue. *Aquaculture* 102: 169–175.
- Taranger, G.L., Hansen, T., 1993. Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 151–156.
- Taranger, G.L., Vikingstad, E., Klenke, U., Mayer, I., Stefansson, S. O., Norberg, B., Hansen, T., Zohar, Y., Andersson, E., 2003. Effects of photoperiod, temperature and GnRH<sub>a</sub> treatment on the reproductive physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) broodstock. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 403–406.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F-A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 483–515.
- Tyler, C.R., Santos, E.M., Prat, F., 2000. Unscrambling the egg – cellular, biochemical, molecular and endocrine advances in oogenesis In: Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds), *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Bergen, Norway, John Greig A/S, 273–280.
- Van Der Kraak, G., Donaldson, E.M., 1986. Steroidogenic capacity of coho salmon ovaria follicles throughout the periovulatory period. *Fish Physiology and Biochemistry* 1: 179–186.

- Van Der Kraak, G., Donaldson, E.M., Dye, H.M., Hunter, G.A., Rivier, J.E., Vale, W.W., 1987. Effects of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones and analogues on plasma gonadotropin levels and ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44: 1930–1935.
- Vazirzadeh, A., Hajimoradloo, A., Esmaeili, H. R., Akhlaghi, M., 2008. Effects of emulsified versus saline administration of GnRHa on induction of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 280: 267–269.
- Vikingstad, E., Andersson, E., Norberg, B., Mayer, I., Klenke, U., Zohar, Y., Stefansson, S.O., Taranger, G.L., 2008. The combined effects of temperature and GnRHa treatment on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry 34: 289–298.
- Watts, M., Pankhurst, N.W., King, H.R., 2004. Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. General and Comparative Endocrinology 135: 381–390.
- Weil, C., Breton, B., Sambroni, S., Zmora, N., Zohar, Y., 1992. *In vitro* bioactivities of various frond of GnRH in relation to their susceptibility to degradation at the pituitary level in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology 87: 33–43.
- Young, G., Crim, L.W., Kagawa, H., Kambegawa, A., Nagahama, Y., 1983. Plasma 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. General and Comparative Endocrinology 51: 96–106.
- Young, G., Adachi, S., Nagahama, Y., 1986. Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one). Developmental Biology 118: 1–8.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and liver. General and Comparative Endocrinology 79: 306–319.
- Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 165: 438–455.

**7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

- Kallert, D.M., Eszterbauer, E., Forró, B., Seyfried, R., Švinger, V., Klupp, R., Speierl, T., Wedekind, H., 2012. Small eye syndrome (SES): Mass mortality among developing brown trout embryos. XIV. joint bi-annual conference of the German, Austrian and Swiss branches, 19th and 21st September 2012 Bautzen (Saxony), Germany. Posterová prezentace Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei in Starnberg. (dedikace: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024)
- Kouřil, J., Barth, T., Štěpán, J., Fila, F., Příhoda, J., Flegel, M., 1987. Umělý výtěr jikernaček lipana podhorního (*Thymallus thymallus* L.) při použití indukované ovulace pomocí analogu LH-RH a hypofýzy. Bulletin VÚRH Vodňany 2: 311. (bez dedikace)
- Kouřil, J., Podhorec, P., Švinger, V., 2009. Hormonálně indukovaná umělá reprodukce ryb (přehled). Sborník z konference 80. výročí vysokoškolské výuky rybářství, MZLU Brno, 66–70. (dedikace: KONTAKT ME10126).
- Kouřil, J., Švinger, V., Mikodina, E.V., Sedova, M.A., Pavlišta, R., Hamáčková, J., 2010. Induced and synchronized ovulation and other improvements of artificial reproduction in northern whitefish (*Coregonus peled*) using hormonal stimulation and anaesthesia In: Litvinenko, A.I., Reshetnikov, Yu, S. (Eds), Biology, Biotechnology of Breeding and Condition of Whitefish Stocks, VII International Scientific and Practical Workshop, Tyumen, Russia, 219–222. (dedikace: KONTAKT ME10126).
- Švinger, V.W., Kouril, J., Pavlista, R., 2010. Induced and synchronized ovulation in Northern whitefish (*Coregonus peled*) using GnRHa (D-Tle<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NET) Lecirelin in different dosages. Aquaculture Europe 2010, 5–8 October, Porto, Portugal, 1279–1280. (dedikace: MSM6007665809, NAZV QH91310 a KONTAKT ME10126)
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2011. The use of different superactive GnRH analogues in artificial reproduction of northern whitefish (*Coregonus peled*). Coregonid Symposium, Mondsee, Austria, September 26–30, 2011, pp. 62. (dedikace: CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a GA JU 025/2011/Z)
- Svinger, V.W., Policar, T., Polakova, S., Steinbach, C., Jankovych, A., Kouril, J., 2011. Induction and advancement of ovulation in brook char (*Salvelinus fontinalis* Mitchell) using administration of emulsified D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>NET-sGnRHa. In: Policar, T., Blaha, M. (Eds), Diversification in Inland Finfish Aquaculture Conference, Pisek, 16–18 May, p. 56. (dedikace: CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a GA JU 025/2011/Z)
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2012a. Synchronization of ovulation in cultured northern whitefish (*Coregonus peled*, Gmelin 1788) using [D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net]-sGnRH analogue and its effect on egg quality. Aquaculture Research, DOI 10.1111/are.12025. (dedikace: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAJU 025/2011/Z, GAJU 047/2010/Z, NAZV QH 71305, Kontakt ME 10126 and NAZV QH91310)

- Svinger, V.W., Policar, T., Steinbach, C., Polakova, S., Jankovych, A., Kouril, J., 2012b. Synchronization of ovulation in brook char (*Salvelinus fontinalis*, Mitchell 1814) using emulsified D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>NET sGnRHa. Aquaculture International, DOI 10.1007/s10499-012-9578-5. In press. (dedikace: CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAJU 047/2010/Z, NAZV QH71305, Kontakt ME 10126 and NAZV QH91310.)
- Švinger, V. W., Hansen, T., Shadrin, Y., Policar, T., Kouril J., 2012c. Induction and advancement of ovulation in wild Arctic grayling (*Thymallus arcticus arcticus*) using D-Tle<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>,NET-mGnRHa Lecirelin. Czech Journal of Animal Science 58: 8–14. (dedikace: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, NAZV QH71305, Kontakt ME ME 10126 and NAZV QH91310)
- Švinger, V.W., Kallert, D.M., Kouřil, J., 2012d. Changes in egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook char (*Salvelinus fontinalis*) after various treatments with D-Arg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>NET sGnRHa. Poster presentation, AQUA 2012, Prague, 1–5 September. (dedikace: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAJU 047/2010/Z and 061/2012/Z, CZ.1.25/3.4.00/10.00314, Kontakt ME 10126 and Alexander von Humboldt Stiftung/Foundation)

## PODĚKOVÁNÍ

Autoři by rádi poděkovali především svým rodinám a blízkým za podporu a toleranci vzhledem k časové náročnosti pokusů, která je dána biologickými charakteristikami lososovitých ryb. Děkujeme panu Dr. Dennisovi Kallertovi, Ronnymu Seyfriedovi, Dr. Robertovi Kluppovi, za možnost provádění pokusů s oběma formami pstruha obecného a za veškerou podporu. Velký dík rovněž patří všem zaměstnancům Rybářství Litomyšl s. r. o (Mirek Fabiánek a Ing. Petr Trnka), FROV (Ing. Pavel Lepič, Ing. Jitka Hamáčková, Luboš Borovka) a panu Dr. Vladimíru I. Zdělenovovi a panu Dr. Jevgenijovi Shadrinovi z Výzkumného ústavu ekologie rybích rezervoárů v sibiřském Krasnojarsku za vysoce profesionální přístup a podporu v průběhu provádění experimentů. Děkujeme rovněž všem oponentům za jejich čas a připomínky při korekci této metodiky.

**Externí odborný oponent**

*Ing. Richard Vachta*

*Rybářské, hydrobiologické a vodohospodářské služby*

*P. Chelčického 371*

*389 01 Vodňany*

**Interní odborný oponent**

*Prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.*

*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*

**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 uplatnění certifikované metodice č. 123/2012 – 16230/Nmet ze dne 21. 12. 2012**

*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. Viktor W. Švinger (90 %)*

*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*

*prof. Ing. Jan Kouřil, Ph.D. (10 %)*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Ústav akvakultury,*

*Husova třída 458/102, 370 05 České Budějovice, www.frov.jcu.cz*

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod.*

*Redakce: RNDr. Bořek Drozd, Ph.D., Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková*

*Náklad: 200 ks, vytištěno v roce 2012, 1. vydání*

*Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk*



**EVROPSKÁ UNIE**

**EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND**

„Investování do udržitelného rybolovu“

