



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Bulletin

VÚRH *V o d ň a n y*

ročník
volume

47/1/2011

leden–březen / January–March

Tato publikace byla vydána z prostředků Evropského rybářského fondu v rámci projektu „Příprava a vydání 47. ročníku odborného čtvrtletníku Bulletin VÚRH Vodňany“ (CZ.1.25/3.1.00/11.00302)



Evropský rybářský fond
„Investice do udržitelného rybolovu“

OBSAH / CONTENTS

Původní články – Original papers

P. HARTVICH, P. DVOŘÁK, M. HOLUB, L. PECHAR, M. ROST, J. MÁŠILKO

5

Antropogenní a povodňové vlivy na ichtyofaunu horního toku Stropnice pod Novohradskými horami • *Antropogenous and flood effects on the river Stropnice upper flow ichthyofauna under the Nové hrady mountains*

M. HAVELKA, E. LEBEDA, M. FLAJŠHANS

17

Molekulární aspekty determinace pohlaví u jeseterovitých ryb • *Molecular aspects of sturgeon sex determination*

M. PŠENIČKA, M. DVOŘÁK, V. KAŠPAR

27

Ultrastruktura jiker jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) a lokalizace zárodečné plasmy jako prekursora primordiálních gonocytů • *Ultrastructure of siberian sturgeon *Acipenser baerii* eggs and localization of germ plasm as precursor of primordial gonocytes*

Překlady článků (zkrácené) – Translations of papers (shortened)

M. HULÁK

35

Genetická diverzita introdukovaných plemen kapra obecného (*Cyprinus carpio*) chovaných v České republice • *Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic*

V. KAŠPAR

41

Zmrazování spermatu tresky obecné (*Gadus morhua* L.): efekt složení extenderu a rychlosti zmrazování na motilitu spermií, rychlost pohybu spermií a jejich morfologii • *Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: Effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology*

Pokyny pro autory

45



ANTROPOGENNÍ A POVODŇOVÉ VLIVY NA ICTHYOFAUNU HORNÍHO TOKU STROPNICE POD NOVOHRADSKÝMI HORAMI

ANTROPOGENOUS AND FLOOD EFFECTS ON THE RIVER STROPNICE UPPER FLOW ICHTHYOFAUNA UNDER THE NOVÉ HRADY MOUNTAINS

P. HARTVICH¹, P. DVOŘÁK¹, M. HOLUB², L. PECHAR³, M. ROST⁴, J. MÁŠILKO¹

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Ústav akvakultury, Husova tř. 458/102, 370 05 České Budějovice, hartvich@frov.jcu.cz, dvorakp@frov.jcu.cz, masilj00@frov.jcu.cz

²Správa Chráněné krajinné oblasti Slavkovský les, Hlavní 504, 353 01 Mariánské Lázně, slavkles@nature.cz

³Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Laboratoř aplikované ekologie, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, lpechar@zf.jcu.cz

⁴Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta ekonomická, Katedra aplikované matematiky, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, rost@ef.jcu.cz

ABSTRACT

*Ichthyofauna of the upper flow of the Stropnice river under Nové Hrady Mountains is strongly influenced by anthropogenic activities. To the referenced section (32–43 km) of flow the outlet from 59 ponds is discharged during the harvest time. In the river bed, various technical adjustments have been gradually implemented. It was detected 15 fish species during ichthyological monitoring of three sections (32.7 – 36.4 – 41.2 km of flow) in the upper half of the Stropnice river flow during 1998, 2000 and 2003. From original fish river species only sporadically gudgeon, *Gobio gobio* (L.) and brown trout (*Salmo trutta m. fario*, L.) occurred. Other species emigrate to the flow from connected reservoirs and ponds. Of these, mostly topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel, 1846), roach, *Rutilus rutilus* (L.), tench, *Tinca tinca* (L.), rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.), Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) and European eel, *Anguilla anguilla* (L.) occurred. Abundance and biomass of fish in selected locations range from 500 to 16650 ind.ha⁻¹, 10.6 to 134.5 kg.ha⁻¹, respectively. The highest values, during particular following years, were found in locality B (36.4 km of flow), where only local maintenance of river bed was applied. The disastrous flood in August 2002 decreased abundance of (in the meantime most abundant) topmouth gudgeon and rudd species. It also increased population of gudgeon and at site B (36 km of flow) where common dace, *Leuciscus leuciscus* (L.) and chub, *Leuciscus cephalus* (L.) were detected.*

Klíčová slova: abundance, biomasa, ichthyologický monitoring, povodeň, rybí migrace

Keywords: abundance, biomass, ichthyological monitoring, flood, fish migration

ÚVOD

Antropogenní zásahy ve vodních tocích mají významný a často i zásadní vliv na změny původního přirozeného charakteru rybního osídlení. Nejvýznamnější změny původní ichtyofauny přináší rybníky a nádrže v povodí, které mají zcela odlišnou rybní obsádku z hlediska druhové skladby než vlastní tok (Hartvich, 1991; Matěnová, 2001; Matěnová a Matěna, 2002; Matěnová a Matěna, 2004). Příkladem takových staveb je v povodí řeky Stropnice přehrada (VD) Humenice a řada rybníků, které svou odlišnou rybní obsádkou ovlivňují celé povodí této řeky. Další ovlivnění přináší též úpravy koryta vlastního toku, které mají zásadní vliv na druhovou skladbu a většinou i výrazně snižují početnost i biomasu rybního společenstva (Lusk, 1990; Hartvich a Šašková, 1993; Hartvich a kol., 2003; Cowx a Welcomme, 1998; Just a kol., 2003). Rekultivační zásahy v nivě pod městem Nové Hradky a zvyšování podílu orné půdy mělo vliv na zazemňování koryta. Pro zlepšení odtokových poměrů byly prováděny technické úpravy rozdílného typu na dílčích částech říčního koryta i přilehlého aluvia řeky Stropnice (Pecharová a kol., 1997; Bodlák, 2001).

Cílem práce bylo posoudit stav ichtyofauny na horním toku řeky Stropnice s ohledem na rozdílné úpravy koryta a vliv rybníků v úseku od obce Petříkov po ČOV v Nových Hradech. Pokusili jsme se rovněž identifikovat důsledky extrémní povodně v srpnu 2002, která výrazně postihla i povodí Stropnice.

ZÁJMOVÁ OBLAST

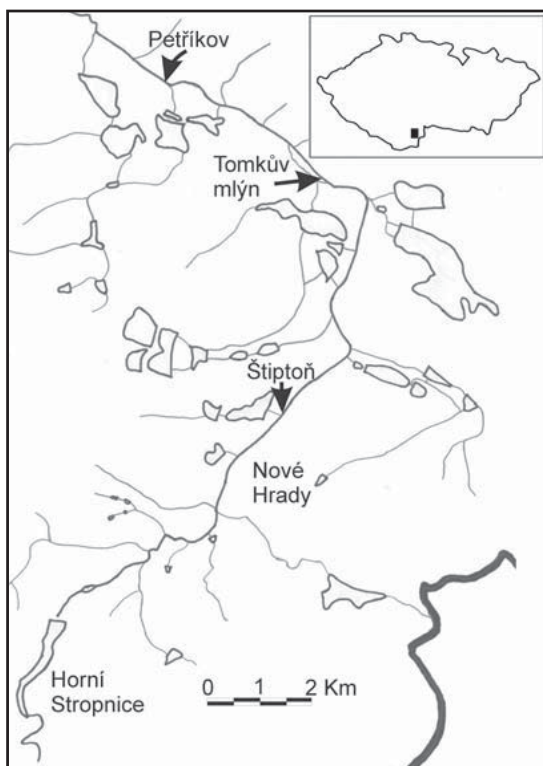
Řeka Stropnice pramení v Rakousku na jihovýchodním svahu hory Vysoká v nadmořské výšce 813 m n. m., protéká sevřeným údolím o značném sklonu přes VD Humenice (46 ř. km, výměra 15,6 ha, objem vody 808 000 m³), dále pak přírodním parkem Terčino údolí u Nových Hradů a pod Dolní Stropnicí ústí z pravé strany do Malše v nadmořské výšce 410 m. Délka toku je 56,6 ř. km při průměrném spádu 7,1 ‰, plocha povodí činí 397 km². Průměrný průtok v ústí do Malše je 2,38 m³.s⁻¹, specifický odtok činí 5,94 l.s⁻¹.km⁻² (Vlček, 1984).

Do toku Stropnice ústí celkem 27 pravostranných a 18 levostranných přítoků. Na celém toku se nachází 10 příčných překážek včetně VD Humenice. Koefficient migrační prostupnosti je 5,66. Většina příčných překážek je bez energetického využití. Účelem VD Humenice je ochrana pozemků při Stropnici pod VD do pětileté vody, v místě ČOV Nové Hradky až dvacetileté vody a zajištění minimálního odtoku ve výši 50 l.s⁻¹. V celém povodí Stropnice je 242 produkčních rybníků, které se využívají převážně k polointenzivnímu chovu kapra (Pecharová a kol., 1997).

Sledovaný úsek řeky (obr. 1) zahrnuje tok Stropnice jihovýchodně od obce Petříkov (32 ř. km), přes Tomkův mlýn a Štiptůň až k ČOV v Nových Hradech (43 ř. km). Do tohoto úseku toku 5. řádu (dle Strahlera, 1957) je vypouštěno celkem 59 rybníků, 8 z nich má rozlohu větší než 10 ha. V úseku od Tomkova mlýna až po Nové Hradky protéká řeka rekultivovanou údolní nivou o šířce dosahující místy až 400 m. Vlastní tok je zde napřímen a opevněn v korytu o šířce cca 2 m. Do koryta z obou stran ústí zatrubněné drenážní vody z údolní nivy. Vodní hladina je oproti povrchu nivy snížena o 1 až 1,5 m (Pecharová a kol., 1997).

Obr. 1. Situační umístění sledovaných lokalit na řece Stropnici.

Fig. 1. Location of monitored sites on the river Stropnice.



Stropnice je hodnocena jako vodohospodářsky významný tok. Horní část toku od státní hranice (55,5 ř. km) až k jezu u Tomkova mlýna (35,8 ř. km) má statut pstruhového revíru (délka toku 15 km, výměra 3 ha). Nádrž Humenice do revíru nepatří. Dominantním druhem horního toku nad nádrží je *Salmo trutta m. fario* (místy se vyskytuje *Cottus gobio*), pod nádrží v Terezině údolí se druhové zastoupení ryb rozšiřuje. Od jezu u Tomkova mlýna až po ústí do Malše tvoří Stropnice mimopstruhový revír (Matěnová, 2001).

Podle Švehly a Chrastného (2004) lze základní hydrochemický typ vody antropogenně neznečištěného horního toku Stropnice nad nádrží Humenice charakterizovat jako vápenato-sodno-síranový. Podle většiny hodnotících ukazatelů kvality se jedná o povrchové vody v I. a II. třídě. K dalšímu snížení kvality vody dochází pod sídlem Horní Stropnice a značným zdrojem znečištění je město Nové Hrady s nevyhovující ČOV. Podle nárůstu BSK₅ a P_{celk.} zde patří Stropnice do IV. třídy jakosti, což je ovlivněné především nárůstem komunálního znečištění.

MATERIÁL A METODIKA

Odlovy ryb ve třech zkoumaných úsecích řeky Stropnice byly prováděny v letech 1998, 2000 a 2003. Termín odlovů byl vždy koncem jarního období a snahou bylo, aby žádný odlov nebyl ovlivněn vypouštěním rybníků. V důsledku povodně v roce 2002 nemohl být uskutečněn plánovaný odlov, a tak byl proveden až v roce 2003. Délka lovených úseků byla vždy 100 m.

Odlov ryb byl prováděn pomocí elektrického agregátu typu FEG 1500 (150–300/300–500 V; 2,5–5 A; 1,5 kW) s motorem Honda FG 200. Zkoumaný úsek byl prolovován dvakrát. Všechny ulovené ryby byly druhově determinovány a byla u nich zjištěna délka těla a hmotnost. Jednotlivé druhy ryb byly rozčleněny do skupin dle jejich ekologických charakteristik (Holčík, 1997). Odhad celkové abundance ryb ve zkoumaných úsecích byl vypočten dle postupu, který uvádějí Seber a Le Cren (1967).

Podle Spellerberga (1995) byly vypočteny Shannon-Wienerův (s použitím přirozeného log.) a Simpsonův (Yulesova) index druhové diverzity a ekvitabilita (Rajchard a kol., 2002).

Použití dvou indexů diverzity bylo žádoucí pro jejich různé výpovědní hodnoty. Shannon-Wienerův index diverzity je silně ovlivněn druhovou pestrostí vzorku, zatímco Simpsonův (Yulesův) index diverzity klade větší váhu na hojně druhy ve vzorku. Pokud jeden druh více početně dominuje, tím je hodnota Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity vyšší.

CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH ÚSEKŮ

Tři sledované úseky se nacházejí v různých částech toku Stropnice (obr. 1), které byly rozdílným způsobem upraveny. Vzhledem k úrovni narušení původního charakteru koryta technickými úpravami byly zkoumané lokality klasifikovány třemi rozdílnými stupni: „přírodě blízká“, „přírodě vzdálená“ a „extrémně přírodě vzdálená“.

Lokalita A – Štiptoň (41,2 ř. km) – se nachází pod ČOV Nové Hrady v rozsáhlém říčním aluviu. V roce 1989 byl tok v úseku od 37,7 ř. km do 43 ř. km zcela zregulován. Koryto má nyní lichoběžníkovitý tvar a je vydlážděno polovegetačními tvárnici. Nad nimi jsou břehy ještě místy zpevněné volně loženým kamenem a celá délka upraveného toku je bez břehových porostů. Rychlému průtoku vody korytem zde nebrání žádné boční výhony, deflektory, zúženiny a ani pohozy dna volně loženým kamenem. Minimální úkrytovou kapacitu zde zajišťují rybám pouze ojedinělé mezery mezi tvárnici a dutiny v opevněném dnu koryta. Břehy nad opevněním jsou pouze zatravněné bez dalšího vegetačního doprovodu. Průměrná šířka toku je v tomto úseku 2,5 m. Po povodni v roce 2002 došlo místy k rozrušení stávajícího opevnění břehů, dna a vytvoření menších tůň a písčinych lavic. Přesto je lokalita klasifikována jako „extrémně přírodě vzdálená“ s technicky upraveným dnem a břehy.

Lokalita B – Tomkův Mlýn (36,4 ř. km) – patří k úsekům, ve kterých byla v minulosti prováděna pouze pravidelná kontrola a pomístní údržba koryta. Jedná se pouze o krátký úsek od 35,8 ř. km po 37,5 ř. km, který se svým charakterem dna, členitostí břehů a vlastním břehovým porostem nejvíce přibližuje přirozenému toku. Rozdílnost dnového substrátu (střídání bahenních překryvů s nánosy štěrkopísku), fluviatilní a torrentilní úseky, střídání tůň a mělčin se submerzním rostlinstvem, přítomnost břehových porostů a z části podemleté břehy poskytují rybám potřebné množství úkrytů. Tato různorodost a především členitost vodního prostředí zlepšuje podmínky pro život ryb. Povodeň v tomto úseku nezpůsobila žádné významnější škody. Průměrná šířka toku je v tomto úseku 4 m. Lokalitu lze klasifikovat stupněm „přírodě blízká“.

Lokalita C – Petříkov (32,7 ř. km) – v roce 1998 bylo v úseku od 31,6 ř. km do 35,7 ř. km provedeno odtěžení bahnitěho sedimentu až na původní podloží, které tvoří převážně štěrkopísky. Břehový porost zůstal zachován, avšak břehy byly strženy a zarovnané, a proto zde zatím není mnoho přirozených úkrytů pro ryby. Průměrná šířka koryta je 5 m, proudivost vody je výrazně nižší než v lokalitě A. Povodeň zde rozrušila zarovnané břehy, částečně je podemlela a koryto bylo opět částečně zaneseno bahnitým sedimentem. Lokalitu lze označit jako „přírodě vzdálenou“ s možností postupné přírodní rehabilitace za předpokladu, že se zde nebudou provádět další rozsáhlé technické úpravy koryta.

VÝSLEDKY

ZMĚNY V ICHTYOFAUNĚ

Ve třech lokalitách řeky Stropnice bylo kontrolními odlovy v letech 1998, 2000 a 2003 zjištěno celkem 15 druhů ryb patřících do 4 čeledí. Jedenácti druhy byla zastoupena čeleď kaprovitých. V tab. 1 je znázorněno zařazení jednotlivých druhů ryb podle jejich ekologických charakteristik. Z hlediska vztahu k proudivosti bylo nejvíce zastoupeno eurytopních druhů – 7, nejméně bylo reofilních druhů – 3. Z hlediska reprodukce převládala reprodukční skupina A.1.5. – (nebudující hnízda, výtěr na otevřeném substrátu, fytofilní), která byla zastoupena 5 druhy.

Celkem 5 druhů (tab. 1) bylo zařazeno do skupiny (III) „s úzkou vazbou na rybniční prostředí“, protože převážně migrují do Stropnice z napojených rybníků. Dalších 6 druhů ryb, bylo zařazeno do skupiny ryb (II) „mající vazbu k říčnímu i k rybničnímu prostředí“, jedná se i o druhy říční, ale jejich populace jsou výrazně podporovány únikem plůdku a mladších jedinců z rybníků. Zbývajících 4 druhy lze považovat za původní označené (I) s „úzkou vazbou k říčnímu prostředí“ a jsou nezávislé na rybnících v povodí.

Tab. 1. Ekologická charakteristika jednotlivých druhů zjištěných v řece Stropnici.

Tab. 1. Ecological characteristics of species found in the river Stropnice.

Čeleď/druh	Vztah k proudivosti	Reprodukční skupina	Vztah k říčnímu či rybničnímu prostředí
CYPRINIDAE			
<i>Alburnus alburnus</i>	Eurytop	A.1.4.	I
<i>Carassius carassius</i>	Limnofil	A.1.5.	III
<i>Cyprinus carpio</i>	Limnofil	A.1.5.	III
<i>Gobio gobio</i>	Eurytop	A.1.6.	I
<i>Leucaspis delineatus</i>	Limnofil	B.1.4.	II
<i>Leuciscus cephalus</i>	Reofil	A.1.3.	I
<i>Leuciscus leuciscus</i>	Reofil	A.1.3.	I
<i>Pseudorasbora parva</i>	Eurytop	B.2.2.	III
<i>Rutilus rutilus</i>	Eurytop	A.1.4.	I
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Limnofil	A.1.5.	II
<i>Tinca tinca</i>	Limnofil	A.1.5.	III
SALMONIDAE			
<i>Salmo trutta m. fario</i>	Reofil	A.2.3.	I
PERCIDAE			
<i>Sander lucioperca</i>	Eurytop	B.2.5.	III
<i>Perca fluviatilis</i>	Eurytop	A.1.5.	II
ANGUILLIDAE			
<i>Anguilla anguilla</i>	Eurytop	A.1.1.	II

A. – nebudující hnízda; A.1. – výtěr na otevřeném substrátu; A.1.1. – pelagofilní; A.1.3. – litofilní; A.1.4. – fytofilní; A.1.5. – fytofilní; A.1.6. – psamofilní; A.2. – ukryvatel jikry; A.2.3 – litofilní; B. – strážčí jikry; B.1. – vyhledávající podklad; B.1.4. – fytofilní; B.2. – budující hnízda; B.2.2. – polyfily; B.2.5. – fytofilní; I – druhy ryb s úzkou vazbou k říčnímu prostředí; II – druhy ryb mající vazbu k říčnímu i k rybničnímu prostředí; III – druhy ryb s úzkou vazbou na rybniční prostředí.

Nejnižší druhová pestrost, abundance i celková biomasa (tab. 2) byla zjištěna v lokalitě A. V roce 1998 činila celková biomasa 16,33 kg.ha⁻¹ při výskytu pouhých 3 druhů ryb (*T. tinca*, *S. erythrophthalmus* a *P. fluviatilis*), jejichž původ lze hledat v napojených rybnících. V následujících letech již tyto druhy nebyly v této lokalitě zaznamenány. V letech 2000 a 2003 byl zaznamenán výskyt *G. gobio*, *P. parva* a *A. anguilla*. Celková abundance ryb stoupala z 500 ks.ha⁻¹ v roce 1998 na 566 ks.ha⁻¹ v roce 2000 až na 713 ks.ha⁻¹ v roce 2003, zatímco celková biomasa klesla z 16,33 kg.ha⁻¹ v roce 1998 na hodnotu 10,56 kg.ha⁻¹ v roce 2000 a po extrémní povodni nepatrně vzrostla na 10,82 kg.ha⁻¹. Početní dominance *G. gobio* vzrostla na 32,6 % v roce 2003 z původních 5,8 % v roce 2000 a zároveň se snížila dominance *P. parva* z 88,4 % v roce 2000 na 62,6 % v roce 2003. Ke zvýšení abundance *G. gobio* došlo až po narušení opevněného dna a břehové linie vlivem povodně v roce 2002, čímž se vytvořily štěrkopískové lavice, které tento druh preferuje. Zvýšila se tak členitost i úkrytová kapacita tohoto "extrémně přírodě vzdáleného" úseku. Tomu nasvědčují i hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity (0,80) a ekvitability (0,73), které byly v roce 2003 nejvyšší (tab. 3). Naopak nejnižší hodnota ekvitability (0,4) a nejvyšší hodnota Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity (0,73) byla v roce 2000. Bez vhodné revitalizace se v této lokalitě trvale nezvýší druhová pestrost, abundance a biomasa ryb.

V lokalitě B bylo celkem zjištěno 15 druhů ryb ze čtyř čeledí. Druhová pestrost, abundance a biomasa ryb je v této lokalitě nejvyšší (tab. 2). Nejvíce taxonů (11 druhů ryb ze čtyř čeledí) bylo zaznamenáno v roce 1998, kdy byla abundance 8 850 ks.ha⁻¹ a biomasa dosahovala hodnoty 127,02 kg.ha⁻¹. V roce 2000 bylo odloveno 10 druhů ryb ze tří čeledí, celková abundance byla 16 650 ks.ha⁻¹ a biomasa 134,5 kg.ha⁻¹. Oproti roku 1998 nebyl zaznamenán výskyt *S. trutta* m. *fario*, *C. gobio*, *A. alburnus* a *T. tinca* ani v roce 2000 a 2003. Naopak v roce 2000 se vyskytoval ještě *S. lucioperca* a *C. carassius*. V roce 2003 se již v odlovech nevyskytovali stejně jako *L. delineatus*. Po povodni, v roce 2003, byla navíc potvrzena přítomnost *L. leuciscus* a *L. cephalus*.

Dvojnásobný nárůst abundance v roce 2000 oproti roku 1998 byl způsoben především výskytem *P. parva*, jejíž početnost se v toku zvyšuje při vypouštění rybníků. Její početní dominance vzrostla na 82 % proti roku 1998, kdy byla 35 %. V roce 2003 bylo odlovem zaznamenáno 8 druhů ze tří čeledí. Abundance činila v tomto roce 7 175 ks.ha⁻¹ a biomasa byla pouze 56,5 kg.ha⁻¹. Toto snížení abundance a biomasy ryb bylo způsobeno téměř tisíciletou povodní z roku 2002. Především druhy označené „III“ (druhy ryb s úzkou vazbou na rybníční prostředí (tab. 1) se nebyly schopny udržet na stanovištích a byly povodní postupně splaveny do nižších partií toku a přes migrační bariéry v podobě jezů jim nebyl umožněn návrat. Zároveň došlo i k propláchnutí okolních rybníků a nádrží, ze kterých již během povodně unikla a byla splavena většina těchto ryb. Při výlovech po povodni pak mohlo uniknout jen menší množství ryb, které neposílily stávající populace v toku tak výrazně jako v jiných letech, a tudíž neměly vliv na zvýšení abundance a biomasy v odlovu provedeném v roce 2003. Za zmínku stojí postupný nárůst abundance i biomasy *G. gobio* během let 1998, 2000 a 2003. Jeho kusová dominance rostla z 0,3 % na 2,3 % až 10,5 %. Naopak docházelo ke snižování abundance i biomasy u *P. fluviatilis* a *R. rutilus*, jak je patrné z tab. 2. U *P. fluviatilis* se kusová dominance snížila ze 40 % v roce 1998 na 4,5 % v roce 2003. Nejvyšší hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity (1,42) a ekvitability (0,59) byly zjištěny v roce 1998. Naopak nejnižší hodnota ekvitability (0,32) a nejvyšší hodnota Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity (0,68) byla v roce 2000. Extrémní povodeň v roce 2002 měla v této lokalitě vliv na snížení abundance a biomasy, které byly více než o polovinu nižší v roce 2003 oproti roku 2000, avšak ekvitabilita i hodnota Shannon-Wienerova indexu diverzity stoupla na 0,54, resp. 1,42 (tab. 3).

V lokalitě C bylo v roce 1998 odlovy zjištěno 5 druhů ryb ze tří čeledí. Abundance byla 3 066 ks.ha⁻¹ a biomasa byla 68,16 kg.ha⁻¹. V roce 2000 bylo zjištěno také 5 druhů ryb, avšak pouze z 1 čeledi. Proti roku 1998 nebyl zaznamenán výskyt *P. fluviatilis*, *A. anguilla* a *L. delineatus*, navíc byl zjištěn výskyt *G. gobio*, *T. tinca* a *S. erythrophthalmus*. Abundance vzrostla na hodnotu 3 555 ks.ha⁻¹, ale biomasa klesla na 16,07 kg.ha⁻¹. Tento nárůst abundance a zároveň hluboký pokles biomasy byl ovlivněn druhem *P. parva*, který v roce 2000 dosáhl kusové dominance 67 %. Naopak kusová dominance klesla u *R. rutilus* z 69 % v roce 1998 na 3,1 % v roce 2000. V roce 2003 byl zaznamenán výskyt 5 druhů ryb ze 2 čeledí. Celková abundance byla v tomto roce 1 733 ks.ha⁻¹ a biomasa ryb 15,54 kg.ha⁻¹. Více než poloviční pokles abundance byl způsoben výrazným poklesem početnosti *P. parva*, který vlivem povodně klesl v kusové dominanci na 19,2 %. Na druhé straně byl pozorován nárůst abundance i biomasy u *S. erythrophthalmus* a také u *R. rutilus* (tab. 2).

Nejvyšší hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity (1,42) a ekvitability (0,88) byly zjištěny v roce 2003. Naopak nejnižší hodnota ekvitability (0,50) a nejvyšší hodnota Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity (0,53) byla v roce 2000 (tab. 3).

Tab. 2. Abundance (ks.ha⁻¹) a biomasa (kg.ha⁻¹) ryb odlovených na třech lokalitách řeky Stropnice v letech 1998, 2000 a 2003.

Tab. 2. Abundance (ind.ha⁻¹) a biomasa (kg.ha⁻¹) of fish caught in three localities in the river Stropnice in years 1998, 2000 and 2003.

Druhy	Lokality								
	Štiptoš (A)			Tomkův mlýn (B)			Petříkov (C)		
	1998	2000	2003	1998	2000	2003	1998	2000	2003
	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B
<i>Sander lucioperca</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	75/0,62	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Gobio gobio</i>	0/0	33/0,5	233/3,6	25/0,25	375/1,95	750/6,5	0/0	1 022/8,2	756/4,53
<i>Leuciscus leuciscus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	75/3,5	0/0	0/0	0/0
<i>Leuciscus cephalus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	50/1,72	0/0	0/0	0/0
<i>Cyprinus carpio</i>	0/0	0/0	0/0	25/1,25	25/47,5	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Carassius carassius</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	25/0,07	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Tinca tinca</i>	67/6,33	0/0	0/0	275/9,8	0/0	0/0	0/0	22/0,08	0/0
<i>Perca fluviatilis</i>	400/8	0/0	0/0	3 550/29,5	1 000/12,97	325/8,12	556/4,04	0/0	89/2,51
<i>Alburnus alburnus</i>	0/0	0/0	0/0	25/0,55	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	33/2	0/0	0/0	150/1,5	200/0,52	375/1,17	0/0	22/0,04	244/3,95
<i>Rutilus rutilus</i>	0/0	0/0	0/0	1 275/42,17	1 300/26,72	575/10,45	2 111/52,57	111/2,53	311/3,84
<i>Salmo trutta morpha fario</i>	0/0	0/0	0/0	25/5,25	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Leucaspis delineatus</i>	0/0	0/0	0/0	300/0,6	25/0,05	0/0	22/0,04	0/0	0/0
<i>Pseudorasbora parva</i>	0/0	500/1,73	447/2,06	3 100/13,65	13 575/29,85	4 950/9,67	333/1, 51	2 378/5,22	333/0,71
<i>Anguilla anguilla</i>	0/0	33/8,33	33/5,16	100/22,5	50/14,25	75/15,37	44/10	0/0	0/0
Celkem	500/16,33	566/10,56	713/10,82	8 850/127,02	16 650/134,5	7 175/56,5	3 066/68,16	3 555/16,07	1 733/15,54

Tab. 3. Shannon-Wienerův index diverzity, Simpsonův (Yulesův) index diverzity a ekvitabilita.**Tab. 3.** Shannon-Wiener diversity index, Simpson (Yules) diversity index and ekvitability.

Indexy diverzity a ekvitabilita	Lokalita								
	Štiptoň (A)			Tomkův mlýn (B)			Petříkov (C)		
	1998	2000	2003	1998	2000	2003	1998	2000	2003
Shannon-Wienerův	0,63	0,44	0,80	1,42	0,74	1,12	0,90	0,80	1,42
Simpsonův (Yulesův)	0,66	0,79	0,50	0,31	0,68	0,50	0,52	0,53	0,28
Ekvitabilita	0,57	0,40	0,73	0,59	0,32	0,54	0,56	0,50	0,88

Abundance a biomasa ryb (tab. 2) se v přepočtu na 1 ha pohybovala v jednotlivých letech na sledovaných lokalitách v rozpětí 500–16 650 ks.ha⁻¹, resp. 10,56–134,5 kg.ha⁻¹. Nejvyšší hodnoty abundance a biomasy byly zjištěny na „přírodě blízkém úseku“ řeky Stropnice, nejnižší pak na „úseku přírodě extrémně vzdáleném“. Z tab. 3 vyplývá, že nejvyšší hodnota Shannon-Wienerova indexu diverzity (1,42) byla shodně zaznamenána v lokalitě B (1998) a v lokalitě C, nejnižší (0,44) pak v lokalitě A (2000). Nejvyšší hodnota Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity (0,79) byla zjištěna v lokalitě A (2000), nejnižší (0,28) v lokalitě C (2003). Nejvyšší hodnota ekvitability (0,88) byla v lokalitě C (2003), nejnižší (0,32) v lokalitě B (2000).

Z 15 druhů ryb zjištěných ve všech třech lokalitách v letech 1998, 2000 a 2003, se vyskytovalo pouze 5 druhů v každé z lokalit alespoň jeden rok (tab. 2). Z těchto pěti druhů má podle tab. 1 pouze *G. gobio* označení „I“ (druhy ryb s úzkou vazbou k říčnímu prostředí), tři druhy *P. fluviatilis*, *S. erythrophthalmus* a *A. anguilla* mají označení „II“ (druhy ryb mající vazbu k říčnímu i k rybníčnímu prostředí) a *T. tinca* „III“ (druhy ryb s úzkou vazbou na rybníční prostředí).

Z tab. 2 vyplývá, že nejvyšší početní zastoupení ve všech lokalitách měla *P. parva*, *G. gobio* a *P. fluviatilis*, *S. erythrophthalmus*, *R. rutilus* a *A. anguilla*. Pouze v jednom roce na lokalitě B byl zjištěn nízký výskyt *S. lucioperca*, *C. carassius*, *A. alburnus* a dále z druhů ryb označených „I“ ještě *L. leuciscus*, *L. cephalus* a *S. trutta* m. *fario*. Tyto 3 druhy jsou jedinými zástupci reofilních ryb v řece Stropnici, kde by měly být dominantními druhy. Vzhledem k tomu, že tyto druhy byly zjištěny pouze v lokalitě B, klasifikované jako „přírodě blízká“, svědčí tento stav o nevhodnosti technických úprav v lokalitách A a C. Tato zjištění poukazují na vysoký vliv okolních rybníků na ichtyofaunu zkoumaného úseku řeky Stropnice. I když byly odlovy prováděny mimo období vypouštění rybníků, přesto se druhy označené „III“ v úlovku vyskytovaly. Svědčí to o schopnosti ryb původem z okolních rybníků vyhledat si v řece náhradní stanoviště k přežití. Každoroční posílení jejich početnosti jim umožňuje udržet se v toku Stropnice i po dobu několika let. Kolísání druhové diverzity, abundance a biomasy ukazuje, že většina druhů nevytvořila v toku stabilní populaci, když jejich výskyt je především určován intenzitou migrací ryb z vypouštěných rybníků.

POVODEŇ V ROCE 2002

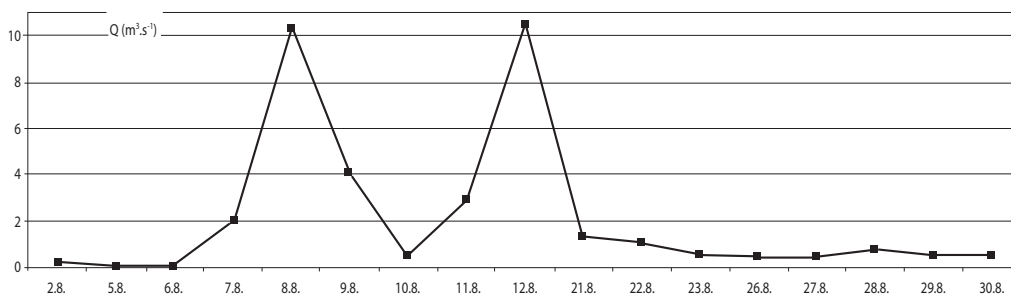
Srážkoměrné stanice v Novohradských horách naměřily za období 6.–15. 8. 2002 srážkový úhrn u obce Dolní Stropnice hodnoty 386 mm (Krátká, 2004). Na měrném profilu Štiptoň je stanoven ČHMÚ průměrný průtok 0,593 m³.s⁻¹, přitom 30denní průtok odpovídá 1,2 m³.s⁻¹. Ještě na začátku srpna 6. 8. 2002 byl odtok z výše položené nádrže Humenice na Stropnici (ř. km 45,3–46,9) pouze 95 l.s⁻¹, avšak už probíhalo kritické srážkové období před první povodňovou vlnou. Jak je zřejmé z obr. 2, další den se zvýšil průtok na 2 m³.s⁻¹ a příští den již na kulminující průtok 10,2 m³.s⁻¹. V následujících dnech se průtok rychle snižoval a od 10. 8. opět narůstal tak, že 12. 8. 2002 znovu kulminoval až na rekordních 10,5 m³.s⁻¹. V příštích dnech

povodňový průtok výrazně klesal až na úroveň průměrného průtoku, když 27. 8. 2002 byl jen $0,44 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Zaplavení nivy, přelítí okolních rybníků a propláchnutí koryta Stropnice proběhlo velmi rychle a způsobilo škody, které vedou správce toku k úvahám řešit situaci dalším zahlubováním již napřímeného koryta, a tím k dalšímu narušování stability krajiny.

Extremně rozsáhlá povodeň v roce 2002 měla mimo jiné i pozitivní vliv na ichtyofaunu v regulovaných lokalitách A a C. Svědčí o tom nejvyšší hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity, ekvitability, a naopak nejnižší hodnoty Simpsonova (Yulesova) indexu diverzity v roce 2003 ze všech tří pozorování (tab. 3).

Naopak v lokalitě B, která je klasifikována jako přírodě blízká, měla povodeň negativní vliv na Shannon-Wienerův index diverzity. Shodně jako ekvitabilita byl Shannon-Wienerův index diverzity v roce 2003 sice vyšší než v roce 2000, avšak nedosahoval hodnot z roku 1998. Povodeň se rovněž projevila ve snížení početnosti těch druhů ryb, které mají úzkou vazbu na rybníční prostředí (především snížení početní dominance *P. parva*).

Povodňový průtok v srpnu 2002 z nádrže Humenice na řece Stropnici



Obr. 2. Povodňový průtok v srpnu 2002 z nádrže Humenice na řece Stropnici.

Fig. 2. Flood flow rate from reservoir Humenice on the river Stropnice in August 2002.

DISKUSE

Z výsledků monitoringu ichtyofauny v lokalitách narušených technickými úpravami říčního koryta vyplývá, že narovnání koryta toku, opevnění dna i břehů i další technické zásahy nepříznivě ovlivňují rybí společenstva horního toku řeky Stropnice, jejíž aluvium postrádá ramenné systémy, tůňe i mokřady.

Výsledky potvrzují, podobně jako předešlá sledování potoků v Novohradských horách a na Šumavě (Hartvich a Šašková, 1993; Hartvich, 1994; Kubečka a kol., 1996), že jednostranně technicky upravený („přírodě extrémně vzdálený“) tok, podobně jako v lokalitě A, má nejnižší hodnoty druhové diverzity, abundance i biomasy ryb. Naopak nejvyšší hodnoty byly zaznamenány na téměř přírodním („přírodě blízkém“) úseku řeky Stropnice v lokalitě B. Lokalita C označená jako „přírodě vzdálená“, kde bylo provedeno odtěžení bahnitého sedimentu až na původní štěrkopíský a zarovnání břehů, má sice vyšší abundanci i biomasu než lokalita A, ale nedosahuje hodnot zjištěných v lokalitě B. V prolovených úsecích toku Stropnice nebyly zjištěny další reofilní druhy *Barbatula barbatula* a *Phoxinus phoxinus*.

Migraci z rybníků se dostávají do řeky limnofilové jako *C. carpio*, *T. tinca*, *S. erythrophthalmus*, *C. carassius* a *L. delineatus* a také eurytopní druhy *S. lucioperca*, *P. fluviatilis*, *R. rutilus*, *A. anguilla*. Ve větší početnosti především nepůvodní druh *P. parva*. Podobně jako na horní Lužnici, jak uvádí Lusk a kol. (2004), dochází u populací *G. gobio* při povodních a po nich

k laterálním přesunům v toku s cílem vyhledat fluviaatilní úseky s nově vytvořenými šterkopis-kovými lavicemi a kamenitými substráty, které preferuje.

Extrémní tisíciletá povodeň v srpnu 2002 vyvolala poproudové migrace ryb, především u limno-filních a eurytopních druhů, které nemají schopnost dlouhodobě odolávat vyšší rychlosti proudění vody (Holčík, 1997; Jowett, 1997). Příkladem k tomu může posloužit tisíciletá povodeň na řece Malší, do které Stropnice ústí. Na třech profilech Malše (Kaplice – 7.8.02, Římov 8.8.02 a při ústí v Č. Budějovicích 15.8.02) byly podle Šercla (2002) naměřeny střední profilové rychlosti proudění vody $1,38\text{--}2,95\text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ a maximální $2,16\text{--}4,03\text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$. Především v technicky upravených úsecích řeky ryby jen obtížně nacházejí vhodná refugia, kde by mohly přečkat negativní působení povodňových průtoků.

Nepříznivé vlivy po nevhodných technických úpravách by mohly alespoň částečně zmírnit dílčí a přírodě blízké úpravy toku, které by měly vést ke zvýšení členitosti toku v příčném i podélném profilu, a tím zlepšit přírodní podmínky pro zvýšení diverzity ichtyofauny (Shields a kol., 1995; Hartvich a kol., 2003; Knaepkens a kol., 2003). Jedná se především o budování vhodných revitalizačních prvků, jako jsou kamenité přehrážky s mezerami, výhony, deflektory, zúženiny, rybí úkryty a další přírodě blízké prvky (Lusk, 1990; Cowx a Welcomme, 1998; Knaepkens a kol., 2002). Tyto úpravy zajišťují střídání hlubších partií toku s mělčími partiemi a zrychlování nebo naopak zpomalování rychlosti proudění vody.

Vhodným zásahem by mohlo být rovněž zmírnění uniformity dnového substrátu (např. střídání volně ložených větších kamenů se šterkovitým nebo s písčítým dnem i s přechodem do bahnitého sedimentu s vodní vegetací a jiné možné úpravy). Tvorbou různých rybích úkrytů se výrazně zvýší početnost a biomasa v toku (Merwald, 1987; Bam a Finn, 1998).

Z dalších revitalizačních zásahů si zaslouží pozornost také břehové dřeviny (Just a kol., 2003), které při dobrém rozmístění porostu dostatečně zastíňují vodní tok, aby v letních měsících nedocházelo k nadměrnému ohřevu vody. Také zpevňují břehy koryta a svými kořenovými systémy tvoří pod vodou vhodný výtěrový substrát a vyhledávané úkryty pro ryby. Je žádoucí, aby další technické zásahy po extrémní povodni v roce 2002 byly řešeny na úrovni „přírodě blízkých“ opatření vedoucích k rehabilitaci druhové diverzity původních rybích společenstev. Podle našich výsledků odlovů by měl být již pstruhový revír od nádrže Humenice až k jezu u Tomkova mlýna převeden do mimopstruhového revíru.

SOUHRN

Ichtyofauna horního toku Stropnice pod Novohradskými horami je výrazně ovlivněna antropogenní činností. Na 45,2 ř. km je vybudována údolní přehrada Humenice, která narušila původní hydrologický systém tohoto toku. Do sledované části (32–43 ř. km) toku je při výloveh vy-pouštěno celkem 59 rybníků. V říčním korytě byly postupně provedeny různé technické úpravy. Při ichtyologickém monitoringu tří úseků (ř. km 32,7–36,4–41,2) v horní polovině toku Stropnice v letech 1998, 2000 a 2003 byl zjištěn výskyt 15 druhů ryb. Z původních říčních druhů se vyskytovaly pouze *G. gobio* a ojediněle *S. trutta m. fario*. Ostatní druhy emigrují do toku z napojených nádrží a rybníků. Z nich se nejčastěji vyskytovaly *P. parva*, *R. rutilus*, *T. tinca*, *S. erythrophthalmus*, *P. fluviatilis* a *A. anguilla*. Abundance a biomasa ryb se ve sledovaných lokalitách pohybovala v rozpětí od 500 do 16 650 ks.ha⁻¹, resp. 10,6–134,5 kg.ha⁻¹. Nejvyšší hodnoty v jednotlivých letech byly zjištěny na lokalitě B (ř. km 36,4), kde byla provedena pouze místní údržba koryta. Naopak nejnižší hodnoty abundance a biomasy byly zjištěny na technicky upravené lokalitě A (ř. km 41,2) s polovegetačními tvárnici opevňujícími dno i břehy. Katastrofální povodeň v srpnu 2002 snížila početnost do té doby nejhojnějších druhů *P. parva* a *R. rutilus*, zvýšila početnost *G. gobio* a na lokalitě B (ř. km 36,4) byl zjištěn výskyt *L. leuciscus* a *L. cephalus*.

PODĚKOVÁNÍ

Sledování byla provedena s podporou projektu MSM 6007665806 a MSM 6007665809, projektů CENAKVA reg. č. CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a GA JU 047/2010/Z.

LITERATURA

- Bam, M.B., Finn, J.T., 1998. Streamflow regulation and fish community structure. *Ecology*, 69(2): 382–392.
- Bodlák, L., 2001. Návrh rekultivace břehových porostů řeky Stropnice. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 76 s.
- Cowx, G.I., Welcomme, I.R., 1998. Rehabilitation of rivers for fish. FAO, 260 pp.
- Hartvich, P., 1991. Změny v ichtyofauně Bezdrevského potoka vlivem znečištění. Sbor. VŠZ, ř. zootechnická 1, České Budějovice: s. 111–122.
- Hartvich, P., 1994. Ichtýofauna potoků na Šumavě mezi údolní nádrží Lipno a státní hranicí. Sborník Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Zemědělské fakulty, ř. zootechnická 1, České Budějovice: s. 73–81.
- Hartvich, P., Šašková, M., 1993. Ichtýofauna Bedřichovského potoka v upraveném korytě a ne-regulovaném toku. Sborník Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Zemědělské fakulty, ř. zootechnická 1, České Budějovice: s. 83–88.
- Hartvich, P., Dvořák, P., Holub, M., Procházka J., 2003. Formování ichtýofauny Mlýnského potoka po provedené revitalizaci a po povodni v srpnu 2002. Collection of Scientific Papers, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture, Series for Animal Science, České Budějovice, 20(2): 169–174.
- Holčík, J., 1997. Ichtýológia. Příroda, Bratislava, 273 s.
- Holčík, J., Hensel, K., 1972. Ichtýologická příručka. Obzor, Bratislava, 217 s.
- Jowett, I.G., 1997. Instream flow methods: a comparison of approaches. *Regulated Rivers and Management*, 13(2): 115–127.
- Just, T., Šámal, V., Dušek, M., Fischer, D., Karlík, P., Pykal, J., 2003. Revitalizace vodního prostředí. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha, 144 s.
- Knaepkens, G., Bruyndoncx, L., Bervoets, L., Eens, M., 2002. The presence of artificial stones predicts the occurrence of the European bullhead (*Cottus gobio*) in a regulated lowland river in Flanders (Belgium). *Ecol. Freshw. Fish*, 11: 203–206.
- Knaepkens, G., Bruyndoncx, L., Coeck, J., Eens, M., 2003. Spawning habitat enhancement in the European bullhead (*Cottus gobio*), an endangered freshwater fish in degraded lowland rivers. *Biodiversity and Conservation*, 9: 1–10.
- Krátká, M., 2004. Vyhodnocení kulminačních průtoků při povodni v srpnu 2002. *Vodní hospodářství* 2, VTEI, 1: 2–6.
- Kubečka, J., Matěna, J., Prachař, Z., Wittingerová, M., Vožechová, M., 1996. Vlivy antropogenních úprav toků: Studie rybiho a bentického osídlení Stropnice. Hydrobiologický ústav AV ČR, České Budějovice, 18 s.
- Lusk, S., 1990. Rybářství a úpravy vodních toků. Hydroprojekt Brno, 65 s.
- Lusk, S., Hartvich, P., Halačka, K., Lusková, V., Holub, M., 2004. Impact of extreme floods on fishes in rivers and their floodplains. *Ecohydrology and Hydrobiology*, 4(2): 147–155.
- Matěnová, V., 2001. Druhové složení ichtýofauny horního toku Stropnice. Sborník Ekotrend, České Budějovice: s. 126–129.

- Matěnová, V., Matěna, J., 2002. Diverzita rybích společenstev Stropnice, Pohořského potoka a Černé v Novohradských horách (jižní Čechy). Biodiverzita ichtyofauny ČR, Ústav biologie obratlovců AV ČR Brno, IV: s. 133–139.
- Matěnová, V., Matěna, J., 2004. Ryby (Actinopterygii) v tekoucích vodách. In: M. Papáček (Editor), Biota Novohradských hor: modelové taxony, společenstva a biotopy. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta, České Budějovice: s. 156–166.
- Merwald, I., 1987. Untersuchung und Beurteilung von Bauweisen der Wildbachverbauung in ihrer Auswirkung auf die Fischpopulation. Mitteilungen der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien, 158, 196 pp.
- Pecharová, E., Bodlák, L., Fošumová, P., 1997. Zhodnocení náhradních rekultivací v nivě řeky Stropnice z hlediska ekologické funkce krajiny, zemědělského využití a ekonomického přínosu. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, Závěrečná zpráva.
- Rajchard, J., Kindlmann, P., Balounová, Z., 2002. Ekologie II. KOPP, České Budějovice, 119 s.
- Seber, F., Le Cren, E.D., 1967. Estimating population parameters from large catches relative to the population. J. Anim. Ecol., 36(3): 631–643.
- Shields, D.F.J.R., Knight, S.S., Cooper, M.C., 1995. Incised stream physical habitat restoration with stone weirs. Regulated River: Research and Management, 10: 181–198.
- Spellerberg, Ian, F., 1995. Biologický a ekologický základ monitorování, část B. Český ústav ochrany přírody, Výzkumné a monitorovací pracoviště Brno, s. 48–52.
- Strahler, A.N., 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. Transaction Amer. Geophysical Union, 38: 913–920.
- Šercl, P., 2002. Terénní měření za povodně v srpnu 2002. Vodní hospodářství, 9: 272–273.
- Švehla, J., Chrastný, V., 2004. Kvalita vody vodních toků a nádrží v Novohradských horách. In: J. Kubeš (Editor), Krajina Novohradských hor. Fyzicko-geografické složky krajiny. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta, České Budějovice, s. 104–108.
- Vítů, L., 1998. Mapování přírody a krajiny horního toku Stropnice jako součást územních systémů ekologické stability. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 77 s.
- Vlček, V. (Editor), 1984. Zeměpisný lexikon ČSR – Vodní toky a nádrže. Academia Praha, 316 s.

MOLEKULÁRNÍ ASPEKTY DETERMINACE POHLAVÍ U JESETEROVITÝCH RYB

Molecular aspects of sturgeon sex determination

M. HAVELKA, E. LEBEDA, M. FLAJŠHANS

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, havelm02@frov.jcu.cz

Abstract

Sturgeons are supposed to belong to the most valuable and endangered fish species around the world especially because of their ability to produce caviar. Rapid decrease of sturgeon wild population brought a market requirement to produce caviar in aquaculture systems. Production of caviar based on all female population held in aquaculture systems would increase profitability of sturgeon breeding because of their late maturity. Distinction of males from females is not possible by morphological characters. Development of non-invasive methods for sexing of sturgeons based on molecular methods could solve this problem. On the other hand, the mechanism of sex determination in sturgeons is poorly understood and no sex-specific markers have been reported in case of sturgeons till now. Here we attempt to briefly summarize the major hypothesis of sturgeon sex determination and provide information about molecular tools used in investigation of potential genetic sex markers.

Klíčová slova: *jeseterovití, determinace pohlaví, sex markery, gynogeneze*

Keywords: *sturgeon fishes, sex determination, sex markers, gynogenesis*

ÚVOD

Jeseterovité ryby se pravděpodobně vyvinuly před více než 200 milióny let a jsou dnes považovány za jednu z nejstarších skupin obratlovců žijících na naší planetě (Bemis a kol., 1997). Studium těchto žijících fosilií nám může poskytnout důležité informace nejen o nich samých, ale také o evoluci samotných obratlovců. Z celkového počtu 27 druhů jeseterovitých ryb žijících na naší planetě je, dle aktuální verze Červené knihy ohrožených druhů, sedmáct druhů klasifikováno jako kriticky ohrožené (IUCN Red List 2010). Tento fakt často limituje možnosti studia těchto ohrožených druhů a vyžaduje rozvoj a dokonalé zvládnutí neinvazivních metod.

Samotné populace jeseterovitých ryb jsou intenzivně drancovány především za účelem získání kaviáru, jednoho z finančně nejhodnotnějších živočišných produktů (Billard a Lecointre, 2001). Z tohoto důvodu se v posledních letech velice rozvíjejí akvakulturní chovy zaměřené jak na znovunavrácení jeseterovitých ryb do volných vod, tak především na produkci kaviáru v řízených podmínkách (Williot a kol., 2001). Za účelem produkce kaviáru je pro akvakulturní chovy nejvýhodnější produkovat a chovat do pohlavní dospělosti pouze samice, a nikoliv samce. Pro produkci celosamičích populací je však nutné dokonale znát systém determinace pohlaví a také je nutné mít vyvinuté vhodné markery, které by umožňovaly jeho empirické zjištění již u raných stádií hospodářsky nejvýznamnějších druhů jeseterů (Flynn a kol., 2006).

Žádný z druhů jeseterovitých ryb nevykazuje morfologické znaky pohlavního dimorfismu, a to dokonce ani v průběhu pohlavní dospělosti (Keyvanshokoooh a Gharaei, 2010). Právě absence těchto morfologických znaků je důvodem pro intenzivní studium fenoménu determinace pohlaví u jeseterovitých ryb. Jako nejvhodnější se doposud jeví použití metod molekulární biologie a nalezení vhodných molekulárních markerů. Toto je však u jeseterovitých ryb do značné míry komplikováno faktem, že všechny druhy jeseterů mají v jádře svých buněk velké množství chromozomů v důsledku polyploidizace v průběhu jejich evoluce (Vasílev a kol., 2009).

Cílem této přehledové práce je shrnutí všech dosud použitých molekulárních metod pro zjištění systému determinace pohlaví u jeseterovitých ryb s využitím významných přehledových prací poslední doby.

GYNONEZE JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM DETERMINACE POHLAVÍ

Studiu gynogeneze u ryb byla v posledních několika dekadách věnována značná pozornost především s ohledem na potenciální přínos v oblasti genetiky a akvakultury (Arai, 2001; Hulata, 2001; Cnaani a Levavi-Sivan, 2009). Gynogeneze může být u ryb hodnotným nástrojem pro studium pohlavní diferenciaci a determinace (Felip a kol., 2001). Celosamičí populace může být pomocí gynogeneze s jistotou docíleno pouze za předpokladu, že samice nese pohlavní chromozomy XX a samec XY, tedy u typu *Drosophila*.

Gynogeneze byla úspěšně indukována u velké řady hospodářsky významných druhů jeseterovitých a veslonosovitých ryb, jako například u jesetera bílého *Acipenser transmontanus* (Van Eenennaam a kol., 1996), lopatonose amerického *Scaphirhynchus platorhynchus* (Mims a Shelton, 1998), veslonose amerického *Polyodon spathula* (Mims a kol., 1997), jesetera ruského *A. gueldenstaedtii* (Recoubratsky a kol., 2003), jesetera hvězdnatého *A. stellatus* (Recoubratsky a kol., 2003; Saber a kol., 2008), bestěra, tj. křížence vyzy velké *Huso huso* a jesetera malého *A. ruthenus* (Omoto a kol., 2005), a dále u jesetera krátkokorpého *A. brevirostrum* (Flynn a kol., 2006), jesetera malého *A. ruthenus* (Fopp-Bayat a kol., 2007) a jesetera sibiřského *A. baerii* (Fopp-Bayat, 2007; Fopp-Bayat, 2010). Avšak žádná z výše uvedených studií nepřinesla jasný důkaz o tom, jaký systém determinace pohlaví má každý samostatný druh. Jistou výjimkou je práce Mimse a kol. (1997). Tito autoři provedli meiotickou gynogenezi u veslonose amerického (*P. spathula*), k aktivaci jiker bylo použito ozářené sperma lopatonose amerického (*S. platorhynchus*) a k retenci pólóvého tělíska bylo využito teplotního šoku. Na základě histologického vyšetření byla prokázána u gynogenů pouze přítomnost ovariální tkáně, z čehož autoři usoudili, že tento druh má systém determinace pohlaví typu *Drosophila*. Na druhou stranu Van Eenennaam a kol. (1999) prokázali přítomnost obou pohlaví u 24 měsíců starých potomků meiotické gynogeneze u jesetera bílého (*A. transmontanus*). Na základě zjištěného poměru pohlaví, který se mezi gynogeny pohyboval v rozpětí 18 % – 50 % samců vůči 50 % – 72 % samic, autoři usoudili, že jeseter bílý (*A. transmontanus*) má systém determinace pohlaví typu *Abraxas*, kde samice nesou pohlavní heterochromozomy ZW a samci pohlavní chromozomy ZZ.

Samičí ZW heterochromozomy, a tudíž i determinaci pohlaví typu *Abraxas* předpokládali ve své práci zaměřené na gynogenezi bestěra i Omoto a kol. (2005). Tito autoři provedli meiotickou gynogenezi podle modelu, který ve své práci publikoval Van Eenennaam a kol. v roce 1996. Gynogenetické potomstvo získané aktivací jiker ozářeným spermatem taktéž bestěra a následným teplotním šokem mělo poměr pohlaví 30 % k 70 % ve prospěch samic. Obdobně prokázali přítomnost obou pohlaví u potomků získaných meiotickou gynogenezí bestěra i Vasíleva a kol. (2009).

Flynn a kol. (2006) použili meiotickou gynogenezí jako nástroj pro studium determinace pohlaví u jesetera krátkokorpého (*A. brevirostrum*). Na základě získaného poměru pohlaví u meiotických gynogenů, které bylo 35 % samců a 65 % samic, byl těmito autory vysloven závěr, že v případě jesetera krátkokorpého nese pohlavní heterochromozomy samice a jedná se tedy s vysokou pravděpodobností o ZW systém, jak je uvedeno v předchozích případech.

Jak uvádí ve své práci Fopp-Bayat (2010), meiotická gynogeneze provedená u jesetera sibiřského (*A. baerii*) taktéž nevedla k produkci celosamičí populace u výsledných gynogenů. U celkem 50 gynogenetických jedinců ve stáří 3 let bylo provedeno histologické vyšetření, z kterého byl stanoven poměr pohlaví 81 % samic k 19 % samců (Fopp-Bayat, 2010).

Zajímavé je, že autorka pro ověření úspěšnosti gynogeneze nepoužila pouze průtokovou cytometrii sloužící k zjištění ploidie, ale také 11 mikrosatelitních lokusů. Analýzu mikrosatelitů využil pro ověření úrovně úspěšnosti gynogeneze již Flynn a kol. (2006), avšak ne v takovém rozsahu jako Fopp-Bayat (2010). Vasileva a kol. (2009) ve své studii taktéž uvedli přítomnost obou pohlaví u 12 měsíců starých meiotických gynogenů jesetera sibiřského (*A. baerii*). Tito autoři však analyzovali pouze 5 potomků této meiotické gynogeneze, což může být z pohledu statistické významnosti posuzováno jako ne úplně dostačující počet.

Závěrem této části je nutné uvést, že gynogeneze poskytuje pouze informace, ze kterých je možno usuzovat na přítomnost jednoho či druhého typu pohlavní determinace, ale neumožňuje nám hlubší pohled do samotné molekulární podstaty této problematiky.

Na tento fakt upozornila například Vasileva a kol. (2009). Výsledky meiotické gynogeneze provedené u jesetera hvězdnatého (*A. stellatus*) odhalily přítomnost pouze potomků samčího pohlaví vyšetřených ve stáří 12 měsíců (Vasileva a kol., 2009). Tento závěr se zdá být velice zajímavým, avšak i dosti kontroverzním tvrzením. Autoři nabízejí v této své práci hned několik vysvětlení pro tento neobvyklý poměr pohlaví u výsledných gynogenů.

1. Pro jesetera hvězdnatého (*A. stellatus*) je charakteristický systém pohlavní determinace typu *Abraxas*, ale gynogenezí lze u tohoto druhu získat pouze potomstvo nesoucí pohlavní chromozomy ZZ samci a WW samice, kde WW je letální kombinace.
2. Samice jesetera hvězdnatého (*A. stellatus*) mají pohlavní chromozomy Z0.
3. Determinace pohlaví je u jesetera hvězdnatého (*A. stellatus*) mnohem komplikovanější a může být podmíněna i interakcí autozomů s heterochromozomy.

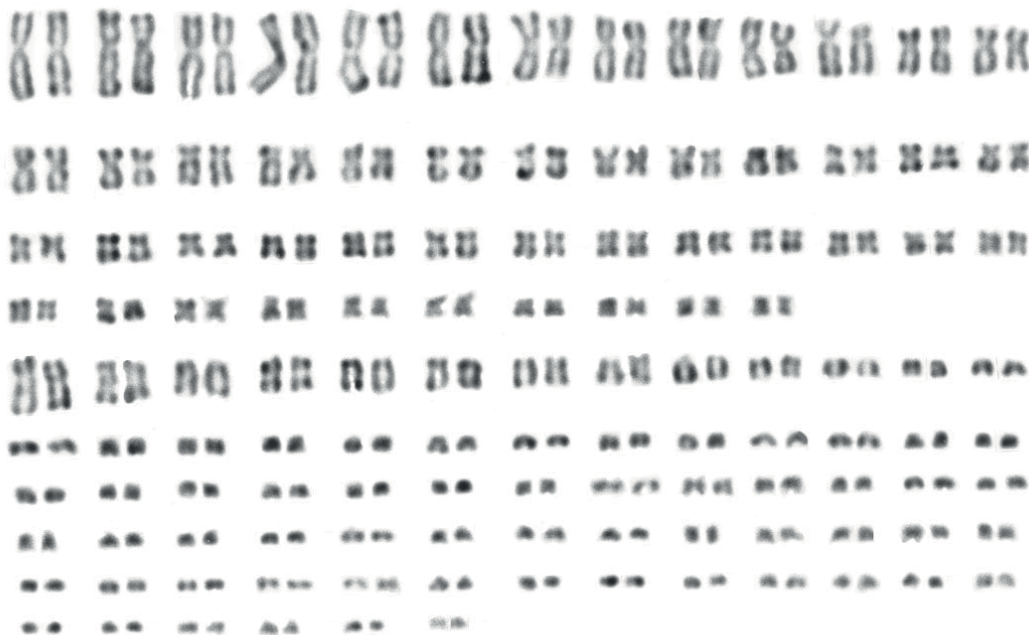
KARYOTYPOVÁNÍ

Obecně lze říci, že jednou z nevhodnějších cest pro objasnění mechanismu pohlavní determinace živočišných druhů je stanovení jejich karyotypů a nalezení pohlavních chromozomů (Devlin a Nagahama, 2002). Ryby prodělaly relativně primitivní evoluci svých pohlavních chromozomů ve srovnání s ostatními obratlovci (Vollf, 2005) a mnoho z nich nemá dodnes zcela vyvinuté heteromorfní pohlavní chromozomy (Devlin a Nagahama, 2002).

Přítomnost morfologicky rozdílných pohlavních chromozomů nebyla dodnes u jesetovitých ryb prokázána (Vasileva a kol., 2009), ale to však nemusí znamenat, že takovéto chromozomy nejsou v genomu jeseterů přítomné. Může to být dáno především tím, že výsledky v podobě karyotypů získaných z metafáze buněčného dělení jsou často velice komplikované, obsahují velké množství mikrochromozomů a jsou obtížné na vyhodnocení. Pro ilustraci je zde uvedený karyotyp jesetera sibiřského (*A. baerii*), jak jej publikoval Fontana (1994).

Obr. 1. Karyotyp jesetera sibiřského (*A. baerii*), dle Fontana (1994).

Fig. 1. Siberian sturgeon (*A. baerii*) karyotype according to Fontana (1994).



MOLEKULÁRNÍ MARKERY POUŽITÉ K OBJASNĚNÍ POHLAVNÍ DETERMINACE JESETEROVITÝCH RYB

Použití molekulárních markerů je jednou z nevhodnějších cest pro objasnění a ranou determinaci pohlaví u živočichů obecně. Takovéto molekulární markery mohou být uplatněny u druhů, kde alespoň jedno pohlaví nese unikátní pohlavní chromozom či DNA sekvenci (Griffiths a Tiwari, 1993). Na druhou stranu je nutné říci, že u ryb bylo v porovnání s ostatními obratlovci doposud objeveno jen velmi málo DNA sekvencí zodpovědných za determinaci pohlaví (Devlin a Nagahama, 2002). Nalezení vhodných DNA sex markerů u jeseterovitých ryb je však ještě komplikovanější než u ostatních druhů ryb a dodnes bylo publikováno pouze pět prací zabývajících se touto problematikou. Souhrnný přehled těchto publikací spolu s použitými metodami a druhy je uveden v tabulce 1.

Tab. 1. Souhrn molekulárních genetických metod použitých ke studiu pohlavní determinace u jeseterovitých ryb a prací, v nichž byly výsledky publikovány.

Tab. 1. Summary of studies using molecular techniques to search for sex-specific markers in sturgeon species.

Studovaný druh	Použitá metoda	Publikace
<i>Jeseter sibiřský (A. baerii)</i>	Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)*	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter jadranský (A. naccarii)</i>	Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)*	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter malý (A. ruthenus)</i>	Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)*	Wuertz a kol. (2006)
Vyza velká (<i>H. huso</i>)	Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)*	Keyvanshokooch a kol. (2007)
<i>Jeseter jezerní (A. fulvescens)</i>	Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)*	McCormick a kol. (2008)
<i>Jeseter sibiřský (A. baerii)</i>	Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter ruský (A. gueldenstaedtii)</i>	Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter jadranský (A. naccarii)</i>	Interrepetitivní PCR (ISSR)***	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter sibiřský (A. baerii)</i>	Interrepetitivní PCR (ISSR)***	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter ruský (A. gueldenstaedtii)</i>	Interrepetitivní PCR (ISSR)***	Wuertz a kol. (2006)
<i>Jeseter velký (A. sturio)</i>	Studium kandidátních genů	Hett a Ludwig (2005)
<i>Jeseter jezerní (A. fulvescens)</i>	Studium kandidátních genů	McCormick a kol. (2008)
<i>Jeseter perský (A. persicus)</i>	Proteomika	Keyvanshokooch a kol. (2009)

* RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

** AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

*** ISSR: Inter-Simple Sequence Repeats

NÁHODNÁ AMPLIFIKACE POLYMORFNÍ DNA (RAPD)

Jedná se o velice rychlou a jednoduchou techniku DNA fingerprintingu, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomových DNA. Obvykle se používá více krátkých primerů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primerů během PCR reakce (Williams a kol., 1990).

Tato metoda byla u ryb úspěšně použita pro objasnění určení pohlaví například u keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*; Kovacs a kol., 2000) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*; Iturra a kol., 2001), ale na druhou stranu nepřinesla uspokojivé výsledky u řady dalších rybích druhů, jako např. u lososa atlantského (*Salmo salar*; McGowan a Davidson, 1998) nebo u čtverzubce zeleného (*Tetraodon nigroviridis*; Li a kol., 2002).

V případě jeseterovitých ryb bylo použití této techniky pro studium sexuální determinace poprvé publikováno Wuertzem a kol. (2006) u jesetera sibiřského (*A. baerii*), jesetera jadranského (*A. naccarii*) a u jesetera malého (*A. ruthenus*). Pomocí celkem 600 primerů autoři objevili celkem 800 markerů u jesetera jadranského (*A. naccarii*), 1 100 markerů u jesetera sibiřského (*A. baerii*) stejně jako u jesetera malého (*A. ruthenus*), ale žádný z nich nebyl vhodný pro určení pohlavní determinace u těchto druhů (Wuertz a kol., 2006).

Keyvanshokooch a kol. (2007) se ve své studii pokusili nalézt sex markery u vyzy velké (*H. huso*) pomocí metody RAPD. V této studii bylo použito celkem 310 primerů, jejichž pomocí bylo určeno celkem 4 146 produktů PCR amplifikace u obou pohlaví. Avšak ani těmto autorům se nepodařilo nalézt DNA fragment či fragmenty zodpovědné za pohlavní determinaci u vyzy velké (*H. huso*), potažmo u jeseterovitých obecně.

Podobně jako v předchozích dvou případech ani McCormick a kol. (2008) nenalezli pomocí metody RAPD žádné DNA sekvence, u kterých by bylo možno s určitostí konstatovat, že se jedná o DNA sex markery.

Otázkou tedy nadále zůstává, zdali je tato metoda zcela nevhodná pro nalezení příslušných fragmentů zodpovědných za determinaci pohlaví u jeseterů, nebo nebyly doposud použity optimální primery či vhodně geneticky modifikovaní jedinci.

POLYMORFISMUS DÉLKY AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ (AFLP)

Tato inovativní metoda slouží k poměrně přesné a dobře reprodukovatelné charakterizaci celkové genomové DNA. Použitím AFLP je možno vizualizovat sadu restričních fragmentů pomocí PCR a následné elektroforézy bez znalosti jejich nukleotidových sekvencí. Na rozdíl od předchozí metody jsou výsledné fingerprinty snadno vyhodnotitelné a reprodukovatelné.

Wuertz a kol. (2006) publikovali ve své studii i výsledky získané metodou AFLP. Autoři použili kombinace 396 primerů v případě jesetera jadranského (*A. naccarii*), 128 primerů u jesetera sibiřského (*A. baerii*) a 296 primerů u jesetera ruského (*A. gueldenstaedtii*). Získali tak 7 700 re-spektive 4 900 a 9 100 DNA fragmentů, v délce od 50 do 600 bp, avšak také bez jakéhokoliv vztahu k pohlavní determinaci u těchto studovaných druhů.

INTERREPETITIVNÍ PCR (ISSR)

Obecně se jedná o typizační techniku pro analýzu celého genomu využívající přítomnosti repetitivních elementů v eukaryotických genomech. Tato metoda je jakousi obdobou RAPD s lepší reprodukovatelností výsledků.

Použití této metody pro objasnění determinace pohlaví u jeseterovitých ryb bylo, dle dostupných literárních zdrojů, publikováno pouze Wuertzem a kol. (2006). Výše zmínění autoři tuto metodu aplikovali u jesetera sibiřského (*A. baerii*), jesetera jadranského (*A. naccarii*) a u jesetera ruského (*A. gueldenstaedtii*) s cílem nalézt sex markery, které by měly přímý vztah k determinaci pohlaví u těchto druhů. I přes poměrně vysoký počet nalezených markerů se ani pomocí této metody nepodařilo nalézt vhodný sex marker (Wuertz a kol., 2006).

STUDIUM KANDIDÁTNÍCH GENŮ

Kandidátní gen je takový úsek DNA, u kterého předpokládáme, že by mohl být zodpovědný za vznik určitého znaku, který je zkoumán.

Hett a kol. (2005) se ve své studii zaměřili na zjištění vlivu genu Sox9 na určení pohlaví u jesetera velkého (*A. sturio*). Genová rodina Sox kóduje evolučně konzervované transkripční faktory, které jsou u člověka a u některých obratlovců úzce vázány s genem SRY, který je umístěn na krátkém rameni Y chromozomu a je přímo zodpovědný za vývoj varlat u samců (Pevny a Lovell-Badge, 1997). Autoři sekvenovali tento gen izolovaný z jednoho samce a jedné samice jesetera velkého (*A. sturio*) a porovnávali tyto sekvence s cílem nalézt rozdíly, které by mohly mít přímý vztah k určení pohlaví jedinců. Stejně jako u ostatních obratlovců, tak i u jesetera velkého (*A. sturio*) obsahoval gen Sox9 tři exony rozdělené dvěma introny, avšak nebyl zde nalezen žádný rozdíl v sekvenci samce a samice (Hett a kol., 2005).

Obdobně ani McCormick a kol. (2008) nenalezli žádné signifikantní rozdíly mezi samci a samicemi jesetera jezerního (*A. fulvescens*) při analýze čtyř kandidátních genů Sox (konkrétně Sox2, Sox4, Sox17 a Sox21).

PROTEOMIKA

Proteomika a studium genové exprese může být alternativou k předchozím metodám, které nepřinesly uspokojivé výsledky na poli sexuální determinace jeseterovitých ryb (Keyvanshokoooh a kol., 2009).

Pomocí analýzy proteinů z ovaríí a testes u jesetera perského (*A. persicus*) našel Keyvanshokoooh a kol. (2009) určité rozdíly mezi samci a samicemi, které se týkaly energetického metabolismu, transkripce a translace a dalších faktorů, neměly však přímý vztah k determinaci pohlaví u tohoto studovaného druhu.

SOUHRN

Jak je patrné z výše uvedených faktů, pohlavní determinace jeseterovitých ryb může být pravděpodobně ještě komplikovanější, než je tomu u ostatních kostnatých ryb. Pomocí genomových manipulací, jako například meiotickou gynogenezí, se doposud podařilo nastinit pouze potenciální možnosti pohlavní determinace u jeseterovitých ryb a u většiny druhů se dá také s určitostí vyloučit systém determinace pohlaví typu *Drosophila*.

Ačkoliv se molekulární biologie jako taková vyvíjí v posledním desetiletí velkou rychlostí, žádná z dosud použitých metod nepřinesla jasný důkaz o molekulárních markerech použitelných pro nalezení a ověření systému determinace pohlaví u jeseterů. Může to být způsobeno především velikostí genomu těchto druhů a také jeho poměrně složitou organizací a velkým počtem mikrochromozomů. Je také nutné připustit fakt, že determinace pohlaví u jeseterů může být ovlivněna i jinými než geneticky podmíněnými faktory, jako jsou například environmentální faktory či interakcemi mezi jedinci.

Lze očekávat, že celogenomové sekvenování přinese v blízké budoucnosti i do této oblasti genetiky jeseterovitých ryb velké množství nových poznatků, které však nemusí zcela postačovat k úplnému pochopení problematiky determinace pohlaví u jeseterů. Otázkou také zůstává, zdali bude vůbec možné takto složitý genom, obsahující dlouhé repetitivní sekvence nukleotidů a velké množství pseudogenů, zcela osekvenovat.

I přes značné množství překážek nám může studium pohlavní determinace jeseterovitých ryb přinést mnoho zajímavých poznatků, které mohou být přínosné jak v oblasti genetiky, tak především v oblasti akvakulturních chovů jeseterů zaměřených na produkci kaviáru.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory projektů CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, MSM6007665809, GAJU 046/2010/Z, GAJU 40/2011/Z, GAČR 523/08/0824.

LITERATURA

- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197: 205–228.
- Bemis, W.E., Findeis, E.K., Grande, L., 1997. An overview of Acipenseriformes. *Env. Biol. Fish.*, 48: 25–71.
- Billard, R., Lecointre, G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 10: 355–392.
- Cnaani, A., Levavi-Sivan, B., 2009. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sexual Development*, 3(2–3): 165–176.
- Devlin, R., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 111: 175–195.
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, 253: 721–727.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37: 888–892.
- Fopp-Bayat, D., 2007. Verification of meiotic gynogenesis in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using microsatellite DNA and cytogenetical markers. *J. Fish. Biol.*, 77: 478–485.
- Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P., 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture*, 264: 54–58.
- Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Aquaculture*, 305: 174–177.
- Griffiths, R., Tiwari, B., 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8324–8326.
- IUCN 2010: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 December 2010.
- Hett, A.K., Ludwig, A., 2005. SRY-related (Sox) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Genome*, 48: 181–186.
- Hett, A.K., Pitra, C., Jenneckens, I., Ludwig, A., 2005. Characterization of Sox9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *J. Hered.*, 96: 150–154.
- Hulata, G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111(1–3): 155–173.
- Iturra, P., Lam, N., de la Fuente, M., Vergara, N., Medrano, J.F., 2001. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica*, 111: 125–131.
- Keyvanshokooh, S., Pourkazemi, M., Kalbassi, M. R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 1–2.
- Keyvanshokooh, S., Kalbassi, M.R., Hosseinkhani, S., Vaziri, B., 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. *Anim. Reprod. Sci.*, 111: 361–368.
- Keyvanshokooh, S., Gharaei, A., 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquac. Res.*, 41: 1–7.
- Kovacs, B., Egedi, S., Bartfai, R., Orban, L., 2000. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica*, 110: 267–276.

- Li, Y., Hill, J.A., Yue, G.H., Chen, F., Orban, L., 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. J. Fish Biol., 61: 1314–1317.
- McCormick, C.R., Bos, D.H., DeWoody, J.A., 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol., 24: 643–645.
- McGowan, C., Davidson, W.S., 1998. The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon. J. Fish Biol., 53: 1134–1136.
- Mims, S., Shelton, W., Linhart, O., Wang, C., 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish, *Polyodon spathula*. J. World Aquacult. Soc., 28(4): 334–343.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1998. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. Aquacult. Int., 6: 323–329.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture, 245: 39–47.
- Pevny, L.H., Lovell-Badge, R., 1997. Sox genes find their feet. Curr. Opin. Genet. Dev., 7: 338–344.
- Recoubratsky, A.V., Grunina, A.S., Barmintsev, V.A., Golovanova, T.S., Chudinov, O.S., Abramova, A.B., Panchenko, N.S., Kupchenko, S.A., 2003. Meiotic gynogenesis in the stellate and Russian sturgeon and sterlet. Russ. J. Dev. Biol., 34: 92–101.
- Saber, M.H., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., 2008. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers. Aquacul. Res., 39: 1483–1487.
- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D., Shedko, S.V., Novomodny, G.V., 2009. Ploidy levels in the kaluga *Huso dauricus* and sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces). Doklady Biological Sciences, 426: 228–231.
- Vasileva, E.D., Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Barmintsev, V.A., Barmintseva, A.E., Volkov, A.A., Badrtdinov, O.A., Kovalev, K.V., Chebanov, M.S., Vasil'ev, V.P., 2009. Genetic mechanisms of sex determination of sturgeon. Problems and perspectives. 6th International Symposium on Sturgeon. October 25–31, Wuhan, Hubei Province, China. Abstracts Oral Presentations, 68–70.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Aquaculture, 147: 177–189.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. J. Hered., 90: 231–233.
- Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity, 94: 280–294.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531–6535.
- Williot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T., Berni, P., 2001. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. Aquat. Libiny Resour., 14: 367–374.
- Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca, J.P., 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by techniques revealed no sex-specific random screening marker. Aquaculture, 258: 685–688.



ULTRASTRUKTURA JIKER JESETERA SIBIŘSKÉHO (ACIPENSER BAERII) A LOKALIZACE ZÁRODEČNÉ PLASMY JAKO PREKURZORA PRIMORDIÁLNÍCH GONOCYTŮ

ULTRASTRUCTURE OF SIBERIAN STURGEON (ACIPENSER BAERII) EGGS AND LOCALIZATION OF GERM PLASM AS PRECURSOR OF PRIMORDIAL GONOCYTES

M. PŠENIČKA, M. DVOŘÁK, V. KAŠPAR

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, e-mail: psenicka@rov.jcu.cz

ABSTRACT

Primordial germ cells (PGCs) are the only cells in developing embryos with potential to transmit genetic information to the next generation. PGCs or subsequently spermatogonia therefore have the potential to be of value for gene banking and cryopreservation, particularly via the production of donor gametes with germ-line chimeras. Nevertheless the first step for successfully transplantation is visualization of PGCs. This is usually done using injection of GFP (green fluorescent protein) mRNA combined with the 3'UTR of germ-line specific mRNA, such as vasa and nanos1, to the area of egg with PGC precursor localization.

Sturgeon model of early embryo development seems to be similar to that of *Xenopus laevis*, where the germ cells can be easily identified very early in embryogenesis, when their differentiation as germ cells is assured by the localization of maternally inherited determinants before fertilization, which is called germ plasm.

Electron microscopic observation at this study revealed three main principal layers, a layer of cortical alveoli in unfertilized eggs and a perivitelline space in fertilized eggs; then germ plasm, containing a precursor of germinal granules, so called nuage, which was dispersed only in the vegetal pole of ovulated sturgeon eggs.

This finding will enable us to direct the injection of GFP to the area of PGC precursors localization in sturgeon eggs and consequently their staining and transplantation.

Klíčová slova: jeseter, primordiální gonocyty, zárodečná plasm, nuage, chimera

Key words: sturgeon, primordial gonocytes, germ plasm, nuage, chimera

ÚVOD

Většina jeseterů patří mezi ohrožené nebo kriticky ohrožené druhy (The IUCN Red List of Threatened Species). Přirozených populací stále ubývá a v akvakultuře je chován jen omezený počet jedinců. Bylo by tedy velice vhodné vyvinout efektivnější systém reprodukce těchto ryb. Genetická a cytogenetická manipulace je u jeseterů velice obtížná, ovšem techniky mikromanipulace gamet, zárodečných buněk a embryí mohou být vhodným nástrojem. Gamety jeseterů jsou unikátními svojí morfologií i funkcí. Jikry jeseterů jsou chráněny velice

silným obalem, perforovaným desítkami mikropylárních otvorů na animálním pólu, zatímco spermie jeseterovitých ryb jsou vybavené akrozomem, který rybí spermie obvykle postrádají (Pšenička a kol., 2010).

Primordiální gonocyty (PGC) u embryí ryb, a následně spermatogonie typu A v případě samců, jsou buňky používané v současné době v biotechnologických aplikacích, pro schopnost přenášet genetickou informaci do dalších generací a které mají stále ještě schopnost vytvářet oba typy gamet. Toho se využívá především pro tzv. germ-line chimérisaci, kdy jsou v těle hosta produkovány gamety donora, kterým může být jedinec stejného nebo blízkého druhu. Germ-line chimera vzniká poté, co PGC nebo spermatogonie úspěšně domigrují do genitálních primordií, kde jsou diferencovány do gamet. Genotyp donora pak může být obnoven v další generaci.

PGC mnoha různých živočichů sdílí vlastnosti, kterými se liší od somatických buněk, často již dávno předtím než se zakládají vlastní gonády. Obecně rozeznáváme dva hlavní způsoby diferenciací zárodečných buněk. U některých živočichů mohou být zárodečné buňky identifikovány velmi časně v embryonální fázi vývoje, kde je jejich diferenciací zajištěna pomocí maternálně děděných determinantů před nebo v průběhu fertilizace. Tento typ diferenciací se nazývá preformace. U jiných živočichů nejsou zárodečné buňky pozorovatelné až do pozdního vývoje a vznikají jako výsledek induktivního signálu sousední tkáně a tento vývoj zárodečných buněk se nazývá epigenese. První studie embryí bezocasých obojživelníků (Bounoure, 1939), kteří vykazují podobný embryonální vývoj jako jeseteři, poskytují první experimentální důkazy o preformaci a roli zárodečné plasmu ve vajíčku při diferenciací zárodečných buněk obratlovců. Během časně oogeneze žábý drápatky vodní *Xenopus laevis* je tato specializovaná plasma syntetizována a lokalizována na vegetativním pólu oocyty, kde se skládá ze shluku desítek až stovek mitochondrií tvořících tzv. mitochondriální mrak neboli Balbianiho cytoplasmu obsahující zárodečnou plasmu (germ plasm). Zde se vyskytují elektrodenzní granule tzv. nuage, které jsou prekurzory zárodečných granulí. Ve fázi oogonií je Balbianiho cytoplasmu patrná v blízkosti jádra jako elektrodenzní materiál obklopený množstvím mitochondrií. V previtelogenní fázi I oocyty má sférickou strukturu, která obsahuje stovky mitochondrií, stovky nuage, RNAs (Xcat2, Xlirts, and Xpat), RNA-binding proteiny, endoplasmatická retikula a Golgiho komplexy. Během previtelogenese a vitelogenese migruje Balbianiho cytoplasmu od jádra k vegetativnímu pólu oocyty a postupně se rozptyluje ve vegetativní cytoplasmě (Heasman a kol., 1984; Houston a King, 2000; Kloc a kol., 2001, 2002; Zhou a King, 1996). Během a následně po fertilizaci je zárodečná plasma vajíčka drápatky vodní nestejně rozptýlena ve vegetativní hemisféře vajíčka, kde je při rýhování buněk nerovnoměrně oddělována a nakonec specificky zabudována do několika buněk, ze kterých se stávají PGC (Whittington a Dixon, 1975). Podobně byla Balbianiho cytoplasmu popsána u oocytů jesetera ruského *Acipenser gueldenstaedtii* v průběhu oogeneze (Zelazowska a kol., 2007), ovšem informace o Balbianiho cytoplasmě nebo zárodečné plasmě u zralých, ovulovaných a oplozených vajíček jeseterů chybí.

Zárodečná plasma, obsahující zárodečné granule specifické pouze pro zárodečné buňky, byla pozorována ve většině fází gametogeneze ryb (PGC, oogonie, oocyty, spermatogonie, spermatocyty, spermatidy) (Eddy, 1975; Wallace a Selman, 1990). Zárodečné granule obsahují proteiny, RNA a jsou prostoupeny fibronukleárním materiálem, ovšem jejich úloha a původ jsou nejasné. Tóury a kol. (1977) a Azevedo (1984) se domnívají, že se účastní vytváření nových mitochondrií a ribozómů. Podle dalších studií představují úložiště RNA a proteinů, které mohou být nezbytné pro diferenciací a nebo vznik PGC (Williamson a Lehmann, 1996; Ikenishi, 1998). V počátečních fázích embryogeneze u medaky japonské *Oryzias latipes* byly zárodečné granule pozorovány ve větším množství v pozdní migraci PGC než na počátku po-

zorování, což naznačuje, že probíhá neo-syntéza tohoto materiálu (Hamaguchi, 1985). S opakovanou syntézou zárodečných granulí je spojena i změna jejich struktury, patrně vyplývající ze ztráty některých jejich složek (Hamaguchi, 1993). Ovšem nejdramatičtější změny ve struktuře granulí jsou popsány na počátku migrace PGC a mohou se tedy podílet na diferenciaci zárodečných linií.

Cílem této studie je (a) popsání ultrastruktury jikry jesetera sibiřského před a po oplození a před a po aktivaci vodou; (b) prokázání přítomnosti nuage, prekursoru zárodečných granulí PGC, jejich lokalizace a popis ultrastruktury ve fázi fertilizace pomocí elektronové mikroskopie.

MATERIÁL A METODIKA

Ke studii byly použity spermie a vajíčka jesetera sibiřského *Acipenser baerii* z chovu Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech. Oplození proběhlo standardně podle metodiky Gela a kol. (2008). Jikry byly 30, 60 s a 30 min po oplození či pouhém aktivování vodou fixovány 2,5% glutaraldehydem v 0,1 mM fosfátovém pufru s pH 7,4 (PBS) přes noc při teplotě 4 °C. Poté byly vzorky třikrát promyty v samotném PBS a poté fixovány 4% oxidem osmičelým v PBS. Pak opět třikrát promyty v PBS a dehydratovány v roztocích acetonu s rostoucí koncentrací 30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100% po 15 min. Infiltrace pryskyřicí Polybed 812 (Polysciences, Inc.) probíhala v řadě roztoků pryskyřice v acetonu se stoupající koncentrací, končící čistou pryskyřicí po dobu 1 h. Vzorky v čisté pryskyřici byly z důvodů lepší infiltrace pryskyřice, odvodu vzorků a zamezení absorbování vzdušné vlhkosti na noc uloženy do exsikátoru napojeného na vodní vývěvu. K zalití vzorků byly použity ploché formy a teplotní polymerizace pryskyřice probíhala v termostatu při teplotě 70 °C po dobu 12 h. Ultratenké řezy byly krájeny pomocí ultramikrotomu (Leica Mikrosysteme GmbH, Rakousko), přičemž jikry byly orientovány podle polohy mikropylárních otvorů. Řezy byly poté kontrastovány 1% octanem uranylu a citrátem olova. Ultratenké řezy z různých částí jiker byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japonsko).

VÝSLEDKY

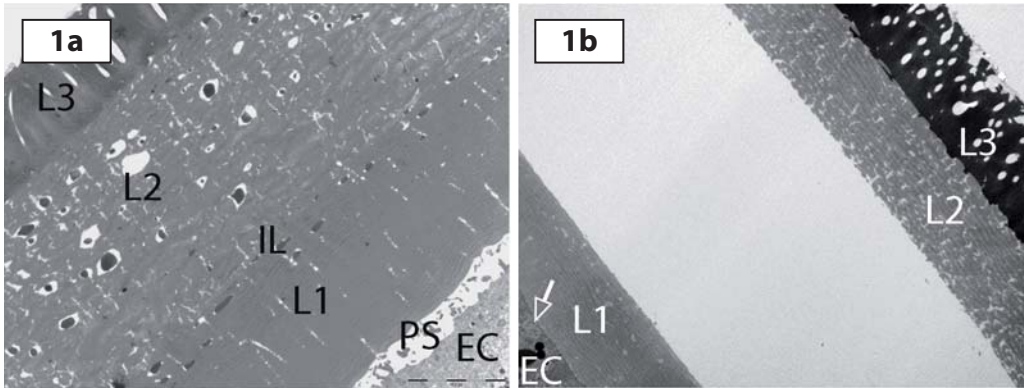
Obal jikry jesetera sibiřského v průběhu oplození obsahuje 3 hlavní vrstvy: alveolární vrstva na povrchu pokryta rosolovitou lepivou vrstvou, zona radiata externa a zona radiata interna. Těsně pod obalem jikry jsou v případě neoplozené jikry kortikální alveoly, které v průběhu aktivace vodou bobtnají a v případě oplozené jikry se zde nachází rychle se zvětšující perivitelinální prostor, dále pak mitochondrie, pigmentové, žlutkové a lipidové granule. Ty se začínají vyskytovat postupně od obalu v uvedeném pořadí, přičemž mitochondrie jsou více obsaženy na animálním pólu pod mikropylárními otvory. Po několika minutách od aktivace vodou jsou alveolární vrstva a zona radiata externa odděleny od zona radiata interna (Obr. 1a, b). Na tento proces nemá oplození žádný vliv, což dokazují neporušené kortikální alveoly na obrázku 1b.

Elektronová mikroskopie dále odhalila shluky elektrodenzních granulí, tzv. nuage (prekursoru zárodečných granulí). Ty byly nalezeny pouze na vegetativním pólu jikry těsně u jikerného obalu, přímo naproti mikropylárním otvorům. Nuage byly v cytoplasmě jikry rozptýleny do 10–20 klastrů, průměrně 268 nm velkých, často v blízkosti několika mitochondrií, endoplasmatických retikul a Golgiho komplexů, ovšem netvořily s těmito organelami žádné komplexy. Jeden klastr nuage obsahoval 10–40 průměrně 23 nm velkých granulí (Obr. 2a, b, c).

U popisovaných jiker byl potvrzen normální průběh fertilizace, což dokazuje kortikální reakce a tvoří se perivitelinální prostor mezi cytoplasmou a obalem vajíčka.

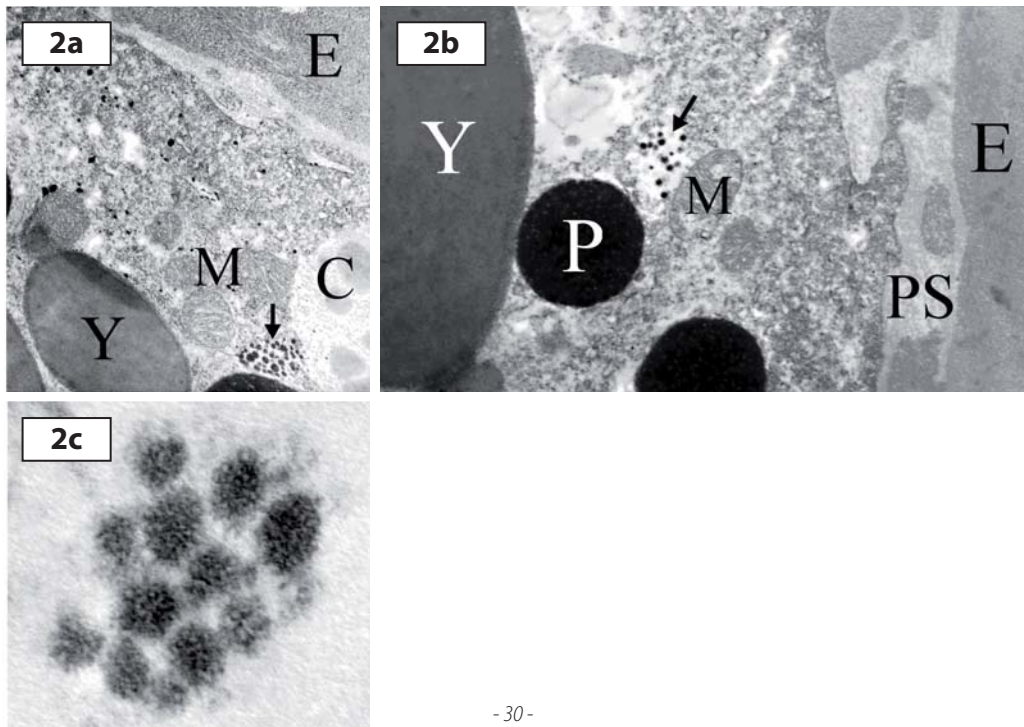
Obr. 1. Snímky z transmisní elektronové mikroskopie 5 000x zvětšené ukazují rozdíly mezi oplozeným vajíčkem po 1 min od aktivace gamet (a) a vajíčkem aktivovaným vodou bez oplození po 30 min (b), kde dochází k oddělení alveolární vrstvy (L3) a zona radiata externa (L2) od zona radiata interna (L1) v místě vmezežené vrstvy (IL). Mezi obaly a cytoplasmou vajíčka (EC) se v případě neoplozeného vajíčka vyskytují kortikální alveoly (šipka) a v případě oplozeného vajíčka periviteliní prostor (PS).

Fig. 1. Transmission electron microscopy, magnification 5000x, shows differences between fertilized eggs 1 min after gametes activation (a) and unfertilized egg, 30 min after activation by water (b), where the alveolar layer (L3) and zona radiata externa (L2) are separated from zona radiata interna (L1) in the interspaced layer (IL). Cortical alveoli (arrow) occur between egg layers and egg cytoplasm (EC) in unfertilized egg and perivitelline space (PS) in fertilized egg.



Obr. 2. Transmisní elektronová mikroskopie jiker 30 s po osemnění (a) 20 000x a (b) 30 000x zvětšeno ukazující nuage (šipka), obal vajíčka (E), mitochondrie (M), periviteliní prostor (PS) nebo kortikální alveoly (C), žlutková granule (Y), pigmentová granule (P) a detail nuage (c) 100 000x zvětšený.

Fig. 2. Transmission electron microscopy, magnification (a) 20000x a (b) 30000x, shows nuage (arrow), egg envelope (E), mitochondria (M), perivitelline proctor (PS) or cortical alveoli (C), yolk granules (Y), pigment granules (P), and detail of nuage (c) with magnification 100000x.



DISKUZE

PGC kostnatých ryb byly na základě morfologických kritérií, a to především na základě přítomnosti zárodečných granulí, zpětně vysledovány až do počátku fáze somitů u karase stříbřitého, *Carassius auratus*, (Kazama-Wakabayashi a kol., 1999), fáze gastruly u medaky (Gamo, 1961) a parmičky nádherné *Barbas conchonioides*, (Timmermans a Taverne, 1989) nebo pozdní fáze blastuly u zebřičky pruhované *Danio rerio* (Nagai a kol., 2001). Cytochemickým značením, injikací fluorescenční sondy – zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) konjugovaným s *vasa* nebo *nanos* genem do jikry po oplození byly PGC nalezeny u zebřičky (Yoon a kol., 1997), medaky (Shinomiya a kol., 2000), pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Yoshizaki a kol., 2000), karase stříbřitého *Carassius auratus* (Otani a kol., 2002) a dalších kostnatých ryb (Saito a kol., 2006). Tyto studie navíc prokázaly druhově specifické rozdíly v původu a migračních drahách PGC, ale zatím se nenašel vztah mezi migračními vzory PGC a fylogenetickou vzdáleností mezi druhy. Proto je důležité k objasnění obecných zásad migrace a původu PGC popsat každý druh zvlášť. U jesetera jadranského *Acipenser naccarii* se migrující PGC podařilo najít zatím pouze histologicky a až v posledních fázích embryonálního vývoje, období kulení (Grandi a Chicca, 2008). Migrující PGC zde byly přibližně 30 x 15 µm veliké, kulovitěho tvaru s nápadným lalokovitým jádrem obsahující jemně zrnitý chromatin a jedno či více jadérek, dále obsahují cytoplasmu bohatou na dlouhé cisterny granulárního endoplazmatického retikula, mitochondrie, prstencovité lamely a zárodečné granule. Ty byly podobné těm popsaným v této studii u oplozených vajíček jesetera sibiřského. Ovšem studie značící PGC jeseterů cytochemicky s možností sledování jejich migrace či transplantace zatím stále chybí. Pro správnou funkci se musí fluorescenční sonda injikovat do míst lokalizace prekurzorů PGC, kterými jsou elektrodenzní granule nuage. V této studii se podařilo nuage lokalizovat na vegetativním pólu oplozené jikry jesetera sibiřského. Můžeme tedy zvolit vegetativní pól jikry jeseterů jako vhodné místo pro injikaci fluorescenční sondy. Navíc tento systém diferenciací PGC naznačuje, že UV ozáření vegetativního pólu jikry jesetera, obsahující prekurzory PGC, může způsobit sterilitu jedince, jak bylo již dříve popsáno u drápatky vodní (Züst a Dixon, 1975), která má podobný počáteční vývoj. To by mohlo způsobit komplikace při aplikacích androgenéze, ovšem při cíleném ozáření vegetativního pólu jikry jesetera by se tohoto dalo naopak využít např. pro potřeby sterilizace hosta určeného k transplantaci PGC.

Dalším technickým problémem injikace jikry jeseterů je síla obalů jikry a prakticky nemožnost jejich penetrace klasickou skleněnou kapilárou. Toto se dá vyřešit mechanickým odstraněním alveolární vrstvy a zony radiaty externy pomocí pinzet po inkubaci vajíček ve vodě (nepublikovaná data), kde dojde k jejich samovolnému oddálení od zony radiaty interny, jak bylo popsáno v této studii.

Značené PGC ryb mohou být dále izolovány a využívány pro genové banky, kryoprezervaci a následně chimérizaci (Yamaha a kol., 2003). Kryoprezervace rybích gamet je zatím možná pouze u spermií, neboť jikry ryb jsou příliš velké a mají silné obaly, přes které neproniknou kryoprotektanty. Kryoprezervace PGC je z hlediska konzervační genetiky více efektivní než kryoprezervace spermií. Úspěšnou transplantací třeba jen jediného PGC můžeme za jeden generační interval získat plně vyvinutou a funkční gonádu transplantovaného druhu (Saito a kol., 2008). Navíc je zde uchována i maternální mtDNA. Ta by byla v případě androgenéze inaktivována společně s genetickou informací jikry. Dalším velice zajímavým potenciálem transplantace PGC je teoretická možnost extrémního zkrácení generačního intervalu některých dlouho dozrávajících druhů. Jejich PGC by mohly být transplantovány do embryí

rychleji dozrávajících druhů. Transplantované buňky by se pak při jejich zrání teoreticky řídily hormonální úrovní hosta. Toho by šlo využít především u později dozrávajících druhů jeseterů, jako např. vyza velká *Huso huso* (18 let) v roli donora a jesetera malého *Acipenser ruthenus* (5 let) v roli hosta. Podobnou myšlenkou se v současné době zabývá např. Tokijská Univerzita Marine Science and Technology, kde uvádějí dva druhy čeledi makrelovitých, tuňáka obecného *Thunnus hynnus* dozrávajícího za 7–8 let při váze 300 kg v roli donora PGC a makrelu obecnou *Scomber scombrus* v roli hosta dozrávající za půl roku při váze 0,3 kg. Pokud by se transplantovaná PGC ujala, tak zde máme předpoklad až 16násobného zkrácení generačního intervalu a inkubace gamet tuňáka v těle makrely prakticky v akváriích (Yoshizaki, 2010). V současné době je tato biotechnologie teoreticky dobře zpracována pro modelové kostnaté ryby, ovšem žádné studie nebyly až do teď zpracovány u jeseterů. Toto je první studie řešící začáteční technické problémy transplantace PGC u jeseterů a naznačující směry, kterými by se mohly další studie zabývat.

SOUHRN

Primordiální zárodečné buňky (PGC) jsou jediné buňky ve vyvíjejícím se embryu s potenciálem přenášet genetickou informaci do dalších generací. PGC nebo později spermatogonie mohou být tedy hodnotné pro genové banky a kryoprezervaci především prostřednictvím produkce gamet získaných chimerizací zárodečných linií. Nicméně prvním krokem pro úspěšnou transplantaci je vizualizace PGC. Ta se provádí většinou injikací GFP mRNA kombinovaného s 3'UTR mRNA specifickou pro buňky zárodečné linie tak jako *vasa* nebo *nanos1*, do oblasti lokalizace prekurzorů PGC.

Model časného vývoje embryí jeseterů se zdá být podobný jako u *Xenopus laevis*, kde je diferenciací zárodečných buněk zajištěna lokalizací maternálně děděného determinantu již před fertilizací. Tento determinant se nazývá zárodečná plasma.

Elektronová mikroskopie v této studii odhalila tři hlavní obaly jikry, vrstvu kortikálních alveol u neoplozených jiker a perivitelinní prostor u oplozených jiker; dále pak zárodečnou plasmu, obsahující prekurzory zárodečných granulí nazývané nuage, které byly rozptýleny pouze ve vegetativním pólu ovulované jikry jesetera.

Tento poznatek nám umožní umístění injikace GFP do oblasti prekurzorů PGC jikry jesetera a tím i jejich značení a transplantaci.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla finančně podpořena projekty GAČR P502/10/P426, GAJU 0462010Z a CENKAVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024.

LITERATURA

- Akhundov, M.M., Fedorov, K.Y., 1991. Early gametogenesis and gonadogenesis in sturgeons, Part 1: On criteria for comparative assessment of juvenile gonadal development in the example of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *J. Ichtyol.*, 31: 101–114.
- Azevedo, C., 1984. Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuage) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Cell Tissue Res.*, 238: 121–128.
- Bounoure, L., 1939. L'origine des Cellules Reproductrices et le Problème de la Lignée Germinale. Paris: Gauthier-Villars.
- Eddy, E.M., 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, 43: 229–280.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH Vodňany, č. 78, 24 s.
- Gamo, H., 1961. On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Appl. Entomol. Z.*, 13: 101–115.
- Grandi, G., Chicca, M., 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei). *J. Morphol.*, 269: 1238–1262.
- Hamaguchi, S., 1985. Changes in the morphology of the germinal dense bodies in primordial germ cells of the teleost (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.*, 240: 669–673.
- Hamaguchi, S., 1993. Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish, (*Oryzias latipes*) treated with puromycin or actinomycin. *Repris. Nutr. Dev.*, 33: 137–141.
- Heasman, J., Quarmby, J., Wylie, C.C., 1984. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev. Biol.*, 105: 458–469.
- Houston, D.W., King, M.L., 2000. A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development*, 127: 447–456.
- Ikenishi, K., 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Diff.*, 40: 1–10.
- Kazama-Wakabayashi, M., Yamaha, E., Yamazaki, F., 1999. The elimination and duplication of lower part of blastoderm effects on the number of primordial germ cells in goldfish. *Fish. Sci.*, 65: 577–582.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A.P., Etkin, L.D., 2001. Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation*, 67: 80–83.
- Kloc, M., Dougherty, M., Bilinski, S., Chan A-P, Brey, E., King, M.L., Patrick, P., Etkin, L.D., 2002. Three dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution in germinal granules in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 241: 79–93.
- Nagai, T., Yamaha, E., Arai, K., 2001. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. *Zool. Sci.*, 18: 215–223.
- Otani, S., Maegawa, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E., 2002. The germ cell lineage identified by *vasa*-mRNA during the embryogenesis in goldfish. *Zool. Sci.*, 19: 519–526.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation proces in sturgeon (*Acipenser*) function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim. Reprod. Sci.*, 117: 147–154.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., Yamaha, E., 2006. Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.*, 50: 691–699.

- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.*, 78: 159–166.
- Shinomiya, A., Tahala, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., 2000. The vasa like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka (*Oryzias latipes*). *Dev. Growth Diff.*, 42: 317–326.
- Timmermans, L.P.M., Taverne, N., 1989. Segregation of primordia germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonioides* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by ³H-thymidine incorporation. *J. Morphol.*, 202: 225–237.
- Toury, R., Clerot, J.C., Andre, J., 1977. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du „ciment“ intermitochondrial isole. *Biol. Cell*, 30: 225–232.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16: 175–201.
- Whittington, P.M., Dixon, K.E., 1975. Quantitative studies of germplasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J. Embryo. Exp. Morphol.*, 33: 57–74.
- Williamson, A., Lehmann, R., 1996. Germ cell development in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12: 365–391.
- Yamaha, E., Murakami, M., Hada, K., Otani, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Sakao, S., Kimura, S., Sato, S., Arai, K., 2003. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica*, 119: 121–131.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N., 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 124: 3157–3166.
- Yoshizaki, G., 2010. Germ cell transplantation in fish: Basic biology and Applications. In: Book of Abstracts, Satellite International Symposium, Reproductive Biology of Aquatic Organisms. June 30, 2010, Okinawa, Japan, p. 11.
- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., Takeuchi, T., 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.*, 55: 364–371.
- Zelazowska, M., Kilarski W., Bilinski, S.M., Podder, D.D., Kloc, M., 2007. Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Tissue Res.*, 329: 137–145.
- Zhou, Y., King, M.L., 1996. Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development*, 122: 2947–2953.
- Züst, B., Dixon, K.E., 1975. The effect of u.v. irradiation of the vegetal pole of *Xenopus laevis* eggs on the presumptive primordial germ cells. *Embryo Exp. Morphol.*, 34(1): 209–220.

GENETICKÁ DIVERZITA INTRODUKOVANÝCH PLEMEN KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) CHOVANÝCH V ČESKÉ REPUBLICE

(rozšířený abstrakt práce publikované v roce 2010 v Aquaculture: Hulák, M., Kašpar, V., Kohlmann, K., Coward, K., Tešitel, J., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Linhart, O., 2010. Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (Cyprinus carpio) strains farmed in the Czech Republic. Aquaculture, 298(3–4): 194–201.)

M. HULÁK

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, e-mail: hulak@frov.jcu.cz

Kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) je pravděpodobně nejznámější kostnatou rybou světa. Je to částečně díky dlouhé historii domestikace a také širokým spektrům introdukcí, které vyústily početnými lokálně adaptovanými divokými liniemi či plemeny. Během dlouhého období vývoje a domestikace se působením různých vlivů vyvinulo z původní divoké formy kapra několik poddruhů a široká škála linií a plemen, jež se od sebe odlišují nejen v morfologických a morfometrických ukazatelích, ale také genetickou strukturou těchto linií a plemen. Variety (plemena a linie) kapra se vyvinuly díky kombinaci faktorů, jako jsou geografická izolace, adaptace, akumulace mutací, přirozená selekce a stejně tak selekční tlak způsobený člověkem.

Cílem této studie bylo zlepšit naše znalosti o molekulárně genetické charakteristice importovaných plemen kapra obecného chovaných v České republice. Použitím 10 mikrosatelitních markrů byla charakterizována genetická variabilita a populační struktura u 11 plemen kapra obecného (tab. 1), včetně dvou plemen pocházejících z Německa (Scheuerman a Glinzig) a Francie (Forez a Dombes) a taktéž plemena Amurského sazana založeného z původní populace divokého říčního kapra z amurské oblasti a jedné ferální populace pocházející z řeky Ebro (Španělsko).

Izolace DNA byla prováděna pomocí E.Z.N.A. Tissue DNA Kitu z produkce firmy Peqlab GmbH. Polymerázová řetězová reakce byla realizována v celkem 35 cyklech, každý z cyklů počínala denaturací při 90 °C po dobu 30 s, poté následoval annealing primerových párů při 55 °C po 45 s (teplota zvolena podle primerových sekvencí popsanych pro dané lokusy, popsanych Crooymansem, 1997). Určení délek alel amplifikovaných mikrosatelitních lokusů bylo prováděno pomocí fragmentové analýzy na automatickém sekvenátoru Beckmann Coulter CEQ 2000 XL.

Průměrný počet alel na lokus (A), úroveň pozorované heterozygotnosti (H_o) a očekávané heterozygotnosti (H_e) a odchylky od Hardy-weinbergové rovnováhy (HWE) byly statisticky zpracovány pomocí programu GENOPOP (Raymond a Rousset, 1995) a GENALEX 6 (Peakall a Smouse, 2006). Analýza molekulární variance (AMOVA) byla statisticky zpracována použitím programu GENALEX (Peakall a Smouse, 2006). Konstrukce fylogenetických stromů byla reali-

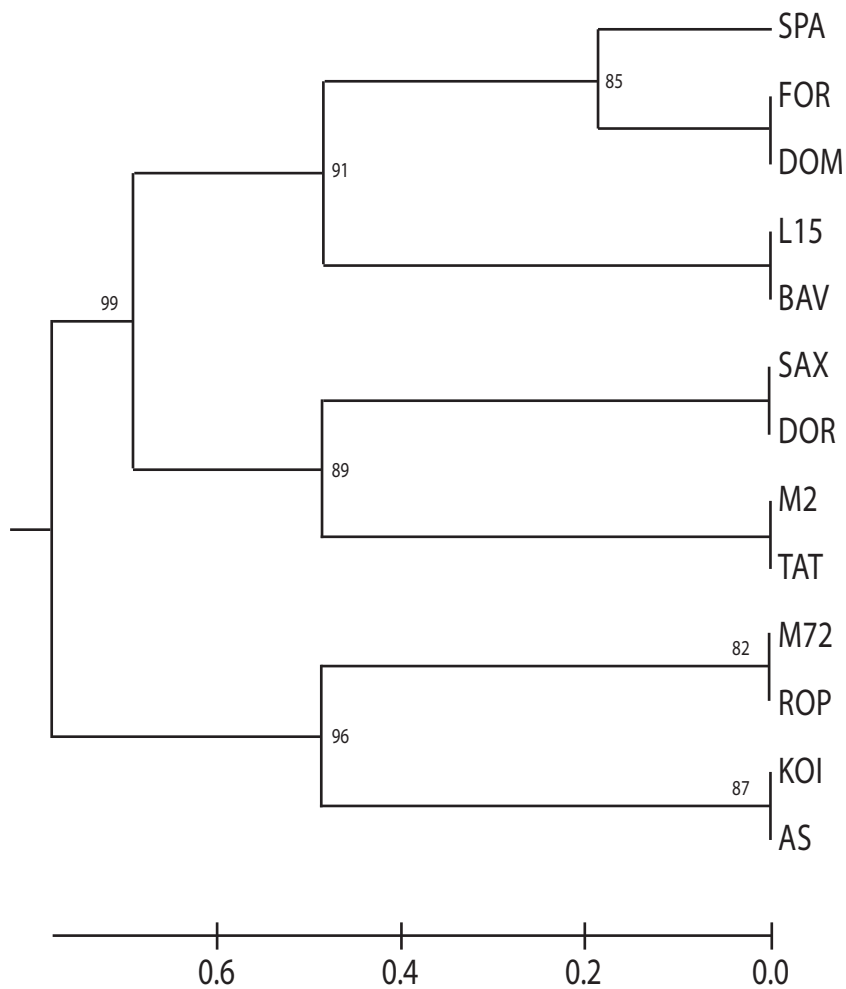
zována použitím statistického programu MEGA4 (Takamura a kol., 2007). Statistický program GeneClass v. 2.0. byl využit k zpětnému přiřazení jedinců ke konkrétnímu plemenu, resp. populaci na základě individuálního genotypu.

Průměrná heterozygotnost u analyzovaných plemen se pohybovala v rozmezí 0,584 až 0,700 s průměrným počtem alel v rozmezí 5,0 až 9,8 za analyzovanou populaci. U všech analyzovaných lokusů byla u 92 ze 130 možných statistických testů zjištěna statisticky významná odchylka ($P < 0,05$) od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a taktéž významný deficit heterozygotů u všech analyzovaných plemen. Z globální analýzy molekulární variance (AMOVA) dále vyplynulo, že 79 % variability frekvence alel lze přičíst na vrub rozdílům v rámci populací, kdežto rozdíly mezi analyzovanými populacemi představovaly 21 % z celkové variability. Fylogenetický strom založený na odhadu genetické vzdálenosti (Nei's D_A) a větrového členění shluků prostřednictvím UPGMA algoritmu zobrazil dva základní fylogenetické klastry, které významně odrážejí příslušnost analyzovaných populací kapra k evropskému/východo-asijskému poddruhu kapra, spíše než k zemi jejich původu (obr. 1). Přiřazení jedinců k původnímu plemenu/populaci pomocí Bayesovské klasifikační metody (self-klasifikace) prokázalo přesnost zpětného přiřazení jedinců ke konkrétnímu plemenu, resp. populaci na úrovni 89,6 % (tab. 2). Závěrem můžeme konstatovat, že sada 10 vysoce polymorfních mikrosatelitů použitých v současné studii prokázala významnou vypovídající hodnotu použitých markérů pro sledování genetické diverzity plemen kapra. Navíc, naše výsledky prokázaly pozitivní účinek konzervačního programu plemen kapra obecného a zdůraznily potřebu lepší kontroly genetické variability kulturních plemen kapra obecného chovaných v České republice.

Tab. 1. Přehled analyzovaných plemen a populací kapra obecného.

Plemeno/populace	Označení populace	Počet anal. vzorků
<i>Rio Ebro – ferální populace</i>	SPA	31
<i>Forez kapr šupinatý</i>	FOR	26
<i>Dombez kapr šupinatý</i>	DOM	30
<i>Maďarský lysec</i>	L15	26
<i>Scheuerman lysec</i>	BAV	25
<i>Glinzig lysec</i>	SAX	23
<i>Izraelský lysec Dor 70</i>	DOR	29
<i>Severský lysec</i>	M72	28
<i>Ropšínský kapr šupinatý</i>	ROP	30
<i>Maďarský lysec</i>	M2	25
<i>Koi kapr</i>	KOI	24
<i>Tatajský kapr šupinatý</i>	TAT	30
<i>Amurský sazan</i>	AS	30

Obr. 1. Fylogenetický strom, metoda UPGMA, distance DA (Nei a kol., 1983).



Tab. 2. Přehled testů zpětného přiřazení (self-klasifikace) u analyzovaných plemen.

Populace/plemeno	SPA	FOR	DOM	L15	BAV	SAX	DOR	M72	ROP	M2	KOI	TAT	AS	Č.	Zpětného přiřazení jedinců %
SPA	28								2			1		31	90,3
FOR		24			1	1			1					26	92,3
DOM			27						1		2			30	90
L15				23					2	1				26	88,5
BAV				2	22			1						25	88
SAX						20		2		1				23	91,3
DOR							27	1		1				29	93,1
M72							1	26	1					28	92,8
ROP							1	1	26				3	30	86,6
M2								1	3	21				25	84
KOI									1		21		2	24	87,5
TAT												27	3	30	90
AS												2	28	30	93,3
Celkem/průměr														320/357	89,6

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM6007665809 a dále projektů NAZV: QH82118 a GAAV: KJB608030901.

LITERATURA

- Crooijmans, R.P.M., Bierbooms, V., Komen, J., Vanderpoel, J.J., Groenen, M., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Anim. Genet., 28: 129–134.
- Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. J. Mol. Evol., 19: 153–170.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes, 6: 288–295.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism. Heredity, 86: 248–249.
- Takamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Bio. Evol., 24: 1596–1599.



ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU TRESKY OBECNÉ (*GADUS MORHUA* L.): EFEKT SLOŽENÍ EXTENDERU A RYCHLOSTI ZMRAZOVÁNÍ NA MOTILITU SPERMÍÍ, RYCHLOST POHYBU SPERMÍÍ A JEJICH MORFOLOGII

(Rozšířený abstrakt práce publikované v roce 2010 v Cryobiology:

Butts, I.A.E., Litvak, M.K., Kašpar, V., Trippel, E.A., 2010.

*Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa:*

Effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. Cryobiology, 61(2): 174–181.)

V. KAŠPAR

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, e-mail: vkaspar@rov.jcu.cz

Treska obecná je historicky nejdůležitějším druhem treskovitých ryb, ať už z pohledu ekonomického nebo kulturního. V průběhu předchozích tří dekad byla většina populací díky nadměrnému rybolovu ohrožena. Požadavky trhu na tento rybí druh v kombinaci se snížením dostupnosti divokých ryb vyústily v zájem o rozvoj akvakulturního chovu tresky v Severním Atlantiku (Brown a kol., 2003, Roselund a kol., 2006).

V současné době je většina akvakulturní produkce založena na reprodukci jedinců odchycených z volných vod (Herlin a kol., 2008; Kolstadt a kol., 2006). Selekční programy dosáhly u mnoha druhů ryb zrychlení růstu o 10–15 % za generaci, obdobné selekční programy v nedávné době začaly být realizovány i u tresky. Genomové technologie v kombinaci se selekčními programy budou využívány k identifikaci tresky s výraznými vlastnostmi komerčního významu (Symonds a kol., 2007).

V průběhu února 2009 byly získávány gamety tresek k umělé reprodukci a testování protokolů kryokonzervace. Ryby byly před manipulací anestetizovány pomocí MS-222, sperma bylo získáváno jemným tlakem na břišní dutinu, tak aby bylo co nejméně zabráněno kontaminaci mořskou vodou, močí a výkaly. Sperma bylo jímáno do nádob o objemu 40 ml a uchováváno na ledové tříšti v místnosti se stálou teplotou 5–6 °C.

Motilita spermíí byla iniciována smísením 0,5 µl čerstvého spermatu nebo 1,5 µl spermatu kryokonzervovaného do mikrozkušavky obsahující 400 µl aktivačního media (mořská voda s 1% BSA (bovine serum albumin)). Pohyb spermíí byl nahráván na ISAS (Integrated Semen Analysis System) s mikroskopem (model M60i, 200x zvětšení, Proejct i Servs R+D S.L., Valencia, Spain) s 20x fázovým kontrastem.

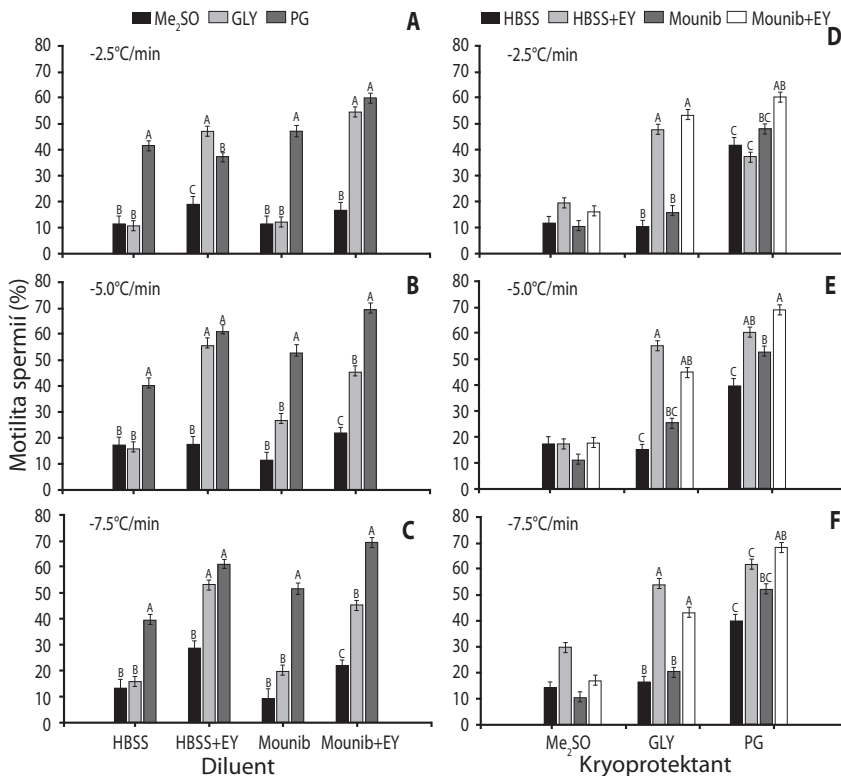
Pro sledování morfologie bylo 10 µl čerstvého nebo 30 µl krokonzervovaného spermatu zředěno v roztoku mořské vody s 2,94% sodium citrátu a důkladně promícháno. Poté bylo nanese no 5 µl tohoto roztoku na podložní sklo a barveno pomocí Hemacoloru (více Tuset a kol., 2008). Z mikroskopických preparátů byly pořízeny digitální fotografie pomocí sestavy mikroskopu a digitálního fotoaparátu, ty byly následně analyzovány pomocí programu ImageJ.

Celý experiment byl realizován v místnosti s teplotou udržovanou na 5–6 °C a všechno vybavení a všechny roztoky vyjma kryoprotektiv byly před použitím vychlazeny na tuto teplotu. Kryoprotektiva byla udržována ve vodní lázni při 20 °C pro udržení viskozity nutné pro přesné pipetování.

V předchozích publikacích byly nejlepší výsledky dosaženy při ředění spermatu v poměru 1 : 3 (sperma a extender) s přidavkem 10% kryoprotektiva (Rideout a kol., 2003; Rideout a kol., 2004; Mounib a kol., 1968). V našem faktoriálním designu bylo testováno celkem 48 různých kombinací diluentu a kryoprotektiva. Sperma bylo po smísení s diluentem a kryoprotektivem plněno do 0,5ml pejet a ty byly zmrazovány pomocí zmrazovacího článku v nádobě s tekutým dusíkem. Rychlosti zmrazování byly zvoleny na 2,5; 5; 7,5 a 10 °C.min⁻¹ v rozmezí do -40 °C, poté bylo zmrazování všech vzorků stejné a to rychlostí 5 °C.min⁻¹ do dosažení -120 °C a poté byly pejety přeneseny do nádoby s tekutým dusíkem.

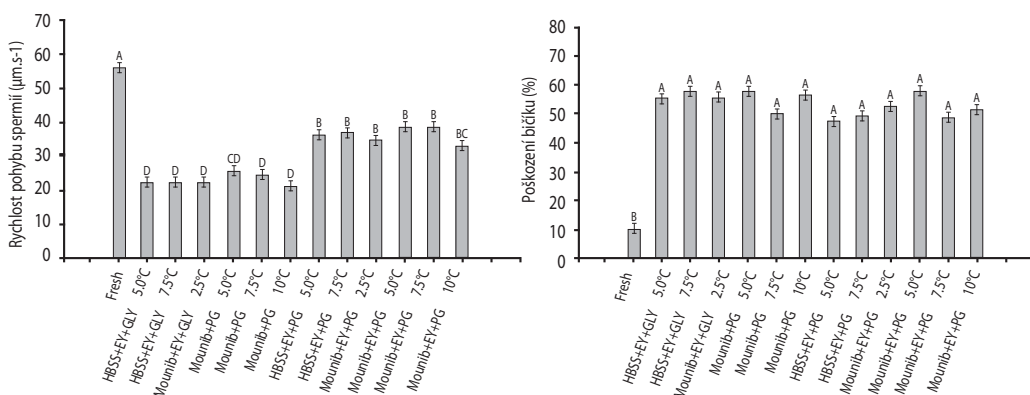
V naší studii byl použit design plně faktoriální ANOVY ke zjištění efektu diluentu (Mounib's sucrose-based diluent, Hanks' Balanced Salt Solution, Mounib's sucrose-based diluent + vaječný žloutek, and Hanks' Balanced Salt Solution + vaječný žloutek), kryoprotektiva (propylene glycol, dimethyl sulphoxide, and glycerol), rychlosti zmrazování (2,5; 5,0; s 7,5 °C.min⁻¹) na motilitu rozmraženého spermatu.

Obř. 1. Výsledky analýzy variance ANOVA pro pohyblivost spermií po rozmrazení. Jednocestná ANOVA byla zpracována pro odhalení efektu kryoprotektiva pro každý z diluentů a diluentu pro každé z kryoprotektiv při třech různých podmínkách zmrazování (zmrazování ze 4 °C do -40 °C rychlostí 2,5; 5 a 7,5 °C.min⁻¹ a poté vždy 5 °C.min⁻¹ do dosažení -120 °C). Hodnoty označené stejným indexem se výrazně nelišily (P < 0,05). HBSS = Hanks' Balanced Salt Solution, Mounib = Mounib's sucrose-based diluent, EY = vaječný žloutek, Me2SO = dimethyl sulphoxide, GLY = glycerol, and PG = propylene glycol.



Podle motility spermií byly nejlepší z metod zmrazování založené na diluentu obsahujícím vaječný žloutek. Směsi obsahující propylene glycol byly charakteristické vyšší motilitou rozmražených spermií než zmrazování pomocí dimethyl sulphoxidu nebo glycerolu. Spermie zmrazované pomocí propylen glycolu navíc měly signifikantně vyšší rychlost pohybu.

Obr. 2. Rychlost pohybu čerstvých a rozmražených spermií tresky a zastoupení spermií s poškozeným bičíkem. Zmrazování ze 4 °C do -40 °C rychlostí 2,5; 5; 7,5 a 10 °C.min⁻¹ a poté vždy 5 °C.min⁻¹ do dosažení -120 °C. Hodnoty označené stejným indexem se výrazně neliší ($P < 0,05$). HBSS = Hanks' Balanced Salt Solution, Mounib = Mounib's sucrose-based diluent, EY = vaječný žloutek, Me₂SO = dimethyl sulphoxide, GLY = glycerol, and PG = propylene glycol.



ANOVA neprokázala rozdíly v ploše hlaviček spermií, délce či šířce u čerstvého a zmrazovaného spermatu. Zastoupení spermií s poškozenými bičíky bylo oproti čerstvému spermatu znatelně vyšší ve všech zmrazovaných vzorcích. Výsledky studie jsou porovnáním různých metodik zmrazování spermatu tresky publikovaných v minulosti, porovnání těchto různých metodik v jediném experimentu však dovoluje přímé porovnání těchto metod a také porovnání efektu rychlosti zmrazování.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projekty MSM6007665809, IAA608030801 a QH82119.

LITERATURA

- Brown, J.A., Minkoff, G., Puvanendran, V., 2003. Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquaculture*, 227: 357–372.
- Herlin, M., Delghandi, M., Wesmajervi, M., Taggart, J.B., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2008. Analysis of the parental contribution to a group of fry from a single day of spawning from a commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) breeding tank. *Aquaculture*, 274: 218–224.
- Kolstad, K., Thorland, I., Refstie, T., Gjerde, B., 2006. Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway. *Aquaculture*, 259: 66–73.
- Mounib, M.S., Hwang, P.C., Idler, D.R., 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. *J. Fish. Res. Board Can.*, 25: 2623–2632.

- Rideout, R.M., Litvak, M.K., Trippel, E.A., 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquacult. Res.*, 34: 653–659.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A., Litvak, M.K., 2004. The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *J. Fish Biol.*, 65: 299–311.
- Rosenlund, G., Skretting, M., 2006. Worldwide status and perspective on gadoid culture. *ICES J. Mar. Sci.*, 63: 194–197.
- Symonds, J.E., Bowman, S., 2007. Atlantic cod genomics and broodstock development in Canada. *Aquaculture*, 272(S1): S313.
- Tuset, V.M., Trippel, E.A., de Monserrat, J., 2008. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J. Appl. Ichthyol.*, 24: 398–405.

Pokyny pro autory

ODBOBNÉ ZAMĚŘENÍ ČASOPISU

Bulletin VÚRH přijímá k publikování a následně po lektorování uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení, přehledové referáty a recenze, týkající se všech aspektů sladkovodního rybářství, ichtyologie a akvakultury. Tato odborná oblast zahrnuje především vědecké práce týkající se: biologie, fyziologie, reprodukce, genetiky, šlechtění, chovu, výživy a nemocí sladkovodních ryb a dále také sladkovodní ekologie, toxikologie, hydrobiologie, rybářské statistiky a ekonomiky chovu ryb. Příležitostně jsou v něm publikovány i příspěvky přednesené na vědeckých a odborných konferencích či seminářích.

AUTORSKÁ PRÁVA PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autor předkládané práce je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. Autor se při předkládání práce do redakce časopisu zaručuje, že tato práce je jeho autorské dílo, které nebylo nikde publikováno a neporušuje (či nebude porušovat) autorská díla třetích osob. První autor předkládané práce přebírá veškerou zodpovědnost za všechny spoluautory práce. Autoři práce se zaručují, že žádná část jejich práce nebude dále publikována či nijak rozšiřována bez souhlasu vydavatele Bulletinu VÚRH Vodňany.

V případě využití částí děl jiných autorů se autor zavazuje dodržovat citační pravidla dle § 31 autorského zákona 121/2000 Sb.

PROCES PŘEDLOŽENÍ, POSOUZENÍ, LEKTOROVÁNÍ A NÁSLEDNÉ UVEŘEJNĚNÍ PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autoři předkládají práce (především odborné a přehledové články) výhradně elektronicky bez tištěného originálu na emailovou adresu **dvorakz@frov.jcu.cz**. Předložená práce je posouzena redakcí časopisu. Poté je práce zaslána ke korektuře. Dva nezávislí odborní oponenti z jiných českých vědecko-výzkumných institucí posoudí předloženou práci z hlediska odborného a věcného. Po korektuře a případných vyžádaných úpravách, které jsou realizovány a odsouhlaseny samotnými autory, je předložená práce doporučena k uveřejnění. O konečném uveřejnění prací rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k vědeckému významu, přínosu a kvalitě předložené práce. Před konečným uveřejněním první autor práce odsouhlasí publikování práce v konečné podobě vlastním podpisem na speciálním formuláři „Souhlas s vytištěním dané publikace“. Po tomto odsouhlasení se práce stává majetkem vydavatele. Všechna následná autorská práva jsou poté chráněna copyrigthem vydavatele.

TECHNICKÁ ÚPRAVA RUKOPISU

Text příspěvku bude zpracovaný v českém jazyce v programu Microsoft Word (pokud možno v co nejaktuálnější verzi) s příponou *.rtf. Vyžadovaný formát příspěvku je: formát stránky A4; řádkování 2; zarovnání textu do bloku; font Times New Roman CE; základní písmo textu velikosti 12; okraje 2,5 cm po všech stranách; stránky i řádky textu budou průběžně číslovány; u každého odstavce bude odsazení prvního řádku 1 cm; žádný text ani informace nesmí být v záhlaví ani v zápatí stránky. Text je doporučeno graficky upravit tak, jak si jej autor přeje otisknout, tedy s vložením tabulek, grafů i obrázků přímo do textu. Vyžaduje se tabulky přímo vytvářet v programu Microsoft Word. Obrázky a grafy se vyžaduje vkládat do textu jako grafický formát „obrázek“ a to v černobílém provedení (stupních šedi). Všechny grafy a obrázky musí být dělány s dostatečným rozlišením, velikostí písma atd., aby byly přehledné a čitelné

i po zmenšení na jednu stránku formátu velikosti B5. Nepřehledné, barevné či jinak neodpovídající grafy a tabulky nebudou do textu zařazeny. Pro kvalitnější otištění se vyžaduje grafy a obrázky zaslat ještě elektronicky ve formátu *.tif, *.bmp, *.jpg. Na každou tabulku, graf či obrázek musí být odkaz v textu (jako např.: tab. 1 nebo obr. 1). U tabulek nejsou povoleny žádné barevné prvky ani stínování buněk tabulky. Nadpis a legenda tabulky, grafu a obrázku jsou vždy umístěny nad tabulkou, grafem či obrázkem velikostí písma 12, s řezem písma obyčejné. Pod českým názvem je vyžadován anglický překlad nadpisu a legendy, který je psán kurzívou s velikostí písma 12.

V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě SI. Pokud autor používá v práci zkratku jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byla zkratka při prvním použití vysvětlena. V názvu práce a v souhrnu se použití zkratk nedoporučuje. Jakékoliv cizí názvosloví je nutné při prvním použití v textu vysvětlit v českém jazyce. Při první zmínce v textu o živočišném či rostlinném taxonomickém subjektu je nutné uveřejnit jejich vědecký český (pokud je znám) i latinský název.

VLASTNÍ ÚPRAVA PRÁCE

Název

Název se píše velkými písmeny, tučně se zarovnáním na střed, velikost písma 14. Anglický název se uvede hned pod český název velkými písmeny, kurzívou (ne tučně), velikost písma 13 se zarovnáním na střed. Mezi českým a anglickým názvem není žádné odsazení řádků.

Autoři

Autorský kolektiv se uvede pod název práce s odsazením jednoho řádku, velikost písma 12, tučně, zarovnání na střed, všechna písmena velká. Uvádí se nejprve počáteční písmeno křestního jména autora následované celým příjmením daného autora. Jednotliví autoři se od sebe oddělují čárkou, za počátečním písmenem křestního jména daného autora se dává tečka (bez čárky).

Afilace

Pod jména autorů se s odsazením jednoho řádku uvádí adresy pracoviště autorů včetně e-mailových adres. Velikost písma 10, kurzíva, zarovnání do bloku. Jsou-li autoři z více pracovišť, uvede se na každý řádek jedno pracoviště a u jednotlivých autorů se jejich příslušnost k adrese vyznačí číslicí s horním indexem za jejich příjmením.

Abstrakt

Po afilaci autorů s odsazením 2 řádků následuje anglický abstrakt. Abstrakt se píše kurzívou, velikost písma 10, zarovnání do bloku. Vypracování abstraktu je nutné věnovat zvláštní péči. Autor do něj má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být zdokumentováno. Abstrakt má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru článku, nikoli však jeho pouhým popisem. V abstraktu se nepoužívají žádné zkratky. Abstrakt musí obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Abstrakt se uvádí jen v jednom odstavci a jeho rozsah je maximálně 250 slov.

Klíčová slova

Klíčová slova následují s odsazením 1 řádku po anglickém abstraktu v českém a následně anglickém jazyce. Velikost písma 10, zarovnání do bloku, klíčová slova v českém jazyce – obyčejný řez písma, klíčová slova v anglickém jazyce – kurzíva.

Úvod

Má obsahovat současný stav studovaného problému a hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna. Je nutno se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům.

Materiál a metodika

Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat. Členění textu na podseky je možné, grafické řešení ale musí být řešeno přehledně a srozumitelně.

Výsledky

Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy a hodnoty. Doporučuje se dát přednost grafickému vyjádření a minimalizovat počet tabulek. Tabulky, grafy a obrázky v textu nesmí obsahovat zdvojené informace. Tzn., co se vyjádří v textu, se již nesmí uvádět v tabulce či jiném grafickém vyjádření.

Diskuse

Obsahuje zhodnocení práce a vlastní postřehy autorů. Výsledky práce se konfrontují s dříve publikovanými výsledky, pokud mají souvislost nebo jsou s předloženou prací srovnatelné.

Souhrn (v českém jazyce)

U původních prací (včetně přehledových prací) následuje po diskusi souhrn v českém jazyce, který je obdobou anglického abstraktu na začátku předložené práce.

Poděkování

Zde se uvádí především titul, číslo a zdroj finančních prostředků poskytnutých k provádění publikované práce a dále poděkování těm spolupracovníkům, kteří svým úsilím jakkoliv významně přispěli k realizaci publikované práce.

Literatura

Všechny publikace citované v textu příspěvku musí být zahrnuty do seznamu použité literatury. Velikost písma u seznamu literatury je 10. První řádek každého literárního odkazu je pedsazen o 1 cm.

Literární odkazy v textu musí obsahovat jméno autora a rok vydání, podle vzoru: (Al-Sabti, 1986); ... jak uvádí Linhart (1991) ... Práce kolektivu tří a více autorů budou v textu citovány podle vzoru: (Kouřil a kol., 1988); ... podle Streisingera a kol. (1984)... V těchto případech však budou u příslušného příspěvku v seznamu literatury uvedeni všichni spoluautoři.

Seznam literatury bude sestaven abecedně podle jmen autorů a chronologicky u jednotlivých autorů podle pořadí: 1) chronologický seznam publikací autora, 2) chronologický seznam publikací téhož autora s jedním spoluautorem, 3) chronologický seznam publikací téhož autora s více než jedním spoluautorem. Více prací jednoho autora v témž roce bude odlišeno písmenem (např. 1989a, 1989b, atd.).

PUBLIKACE BUDOU V SEZNAMU LITERATURY UVEDENY PODLE VZORU:

Publikace v periodikách:

Svobodová, Z., Vykusová, B., Máchová, J., Bastl, J., Hrbková, M., Svobodník, J., 1993. Monitoring cizorodých látek v rybách z řeky Jizery v lokalitě Otradovice. Bull. VÚRH Vodňany, 29(1): 28–42.

Publikace z konferencí ve sbornících a zvláštních vydáních periodik:

Flajšhans, M., Ráb, P., Kálal, L., 1993. Genetics of salmonids in Czechoslovakia: Current status of knowledge. In: J.G. Cloud and G.H. Thorgaard (Editors), Genetic Conservation of Salmonid Fishes. Proceedings of NATO.ASI, June 24 – July 5 1991 at Moscow, ID and Pullman, WA, U.S.A. Plenum Press, New York: pp. 231–242.

Knižní publikace:

Bartík, M. and Piskač, A. (Editors), 1981. Veterinary toxicology. Developments in Animal and Veterinary Sciences, 7. Elsevier, Amsterdam, 346 pp.

Další zdroje publikací:

Citace nepublikovaných příspěvků se neuvádějí. Informace v dopise se uvádí zkratkou (in litt.), osobní sdělení zkratkou a časovým údajem, tj. rokem (Fuka, os. sděl., 1993); podle Fuky (os. sděl., 1993). Při nedostupnosti původního zdroje se citace uvádějí formou: Meske, 1983 (ex Hamáčková a kol., 1993).

PŘÍSPĚVKY, KTERÉ NESPLŇUJÍ POŽADAVKY DLE POKYNŮ PRO AUTORY, BUDOU PŘED POSOUZENÍM A VLASTNÍM LEKTOROVÁNÍM VRÁCENY ZPĚT K PŘEPRACOVÁNÍ.
