

Mendelova univerzita v Brně
Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně
Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i.

Ověřená technologie

TECHNOLOGIE R22/2018

Výsledky chovu lososovitých ryb různého genetického původu

prof. Dr. Ing. Jan Mareš
Ing. Eva Poštulková
Doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.
Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Brno

2018

Ověřená technologie je realizačním výstupem výzkumného projektu MZe NAZV QJ1510077 Zvýšení a zefektivnění produkce lososovitých ryb v ČR s využitím jejich genetické identifikace. Uvedený projekt přispěl k rozvoji výzkumných organizací podílejících se na řešení projektu – Mendelovy univerzity v Brně, Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně a ÚBO AV ČR v.v.i.

Podíl autorů:

prof. Dr. Ing. Jan Mareš¹ 40 %, Ing. Eva Poštulková¹ 10%,

Doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.² 25%, Mgr. Jan Mendel, Ph.D.³ 25%

Adresa autorů:

¹Oddělení rybářství a hydrobiologie, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, Brno 602 00

²Ústav ekologie a chorob zvířat, ryb, včel, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 602 00 Brno

³Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v.v.i., Květná 8, Brno 603 65

Mendelova univerzita v Brně

ISBN 978-80-7509-625-8

Obsah

1.	Cíle technologie	4
2.	Popis technologie	4
3.	Oblast výzkumu	4
4.	Úvod	4
5.	Molekulární determinace lososovitých ryb rodu <i>Salvelinus</i> a <i>Oncorhynchus</i>	4
5.1.	Ověření druhového statusu sivenů a jejich hybridů metodami molekulární genetiky	5
5.2.	Ověření liniové příslušnosti pstruha duhového metodami molekulární genetiky	6
6.	Ověření různé druhové a liniové odolnosti vůči vybraným onemocněním	8
6.1.	Ověření různé druhové a liniové odolnosti lososovitých ryb vůči proliferativnímu onemocnění ledvin	8
6.2.	Ověření různé druhové a liniové odolnosti vůči furunkulóze lososovitých ryb	12
7.	Produkční výsledky chovu vybraných druhů a linií lososovitých ryb	16
7.1.	Porovnání produkčních parametrů vybraných skupin lososovitých ryb v provozních podmínkách	16
7.2.	Porovnání produkčních parametrů tří skupin lososovitých ryb v experimentálních podmínkách	10
8.	Novost postupů	22
9.	Ekonomické aspekty	22
10.	Popis uplatnění technologie	23
11.	Poděkování	23
12.	Seznam literatury	24

1. Cíle technologie

Cílem této technologie je seznámení rybářských subjektů, zejména chovatelů lososovitých ryb, ale i orgánů státní veterinární správy a vzdělávacích a výzkumných organizací s výsledky stanovení vlivu původu lososovitých ryb na vnímavost nebo odolnost k vybraným onemocněním, které v současnosti způsobují značné ztráty v našich chovatelských zařízeních. Dále pak se současnou úrovní genetické identifikace původu chovaných lososovitých ryb a možností využití DNA servisu. Součástí je i přehled některých výsledků o produkčních parametrech lososovitých ryb rozdílného původu.

2. Popis technologie

V letech 2011 - 2018 byl proveden odběr vzorků tkání lososovitých ryb za účelem jejich genetické identifikace. Souběžně probíhal monitoring výskytu onemocnění včetně jeho roční dynamiky na vybraných chovatelských zařízeních. V návaznosti na primárně získaná data byl cíleně monitorován výskyt dvou vybraných onemocnění u lososovitých ryb různého původu s jejich přesným genetickým určením na zařízení provozního partnera. Pozornost (od roku 2015) byla zaměřena zejména na výskyt proliferativního onemocnění ledvin (PKD) a vnímavost ryb s ohledem na jejich původ a furunkulózy. S mírným časovým odstupem byla dále realizována experimentální infekce v experimentálním zařízení VÚVeL v.v.i. druhým ze sledovaných onemocnění, a to furunkulózou. Hlavním hodnoceným parametrem byl výskyt onemocnění a výše ztrát s ohledem na genetický základ chovaných ryb. Dále v rámci ověřování technologie chovu lososovitých ryb různého původu byly sledovány a produkční parametry těchto ryb, a to jak v provozních, tak i experimentálních podmínkách.

3. Oblast výzkumu

Ověření technologie: odběr vzorků pro genetické analýzy – BioFish s.r.o a řada dalších provozních podniků v ČR, MENDELU. Provedení analýz – ÚBO AV ČR v.v.i. Odchov ryb – BioFish s.r.o. a MENDELU, provedení experimentální nákazy – zařízení VÚVeL v.v.i.

4. Úvod

V navazujícím textu budou ve třech částech prezentovány výsledky z oblasti genetické analýzy, veterinární problematiky a výsledky z chovu ryb prezentovány postupně podle oblastí. Vždy bude popsána metodika, výsledky a závěry pro každou oblast.

5. Molekulární determinace lososovitých ryb rodu *Salvelinus* a *Oncorhynchus mykiss*

Ověřovací genetické techniky vycházejí z dlouhodobých monitoringů stavu českých chovů lososovitých ryb, prováděných v letech 2011 - 2018. Proces determinace byl nastaven díky spolupráci 22 českých a zahraničních chovných zařízení. Sběrový materiál obsahoval 25 chovných zdrojů pstruha duhového vyskytující se běžně na evropském trhu, ale také i linie

pstruha duhového z ČR - vlastní a národní plemena (Mendel et al., 2018a). Dále obsahoval i populace 4 druhů sivenů, jmenovitě *Salvelinus fontinalis*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus umbla*, *Salvelinus namaycush* z českých chovů a evropských chovů/jezer. Vyvinuté techniky byly otestovány na cca 1300 vzorcích, mezi kterými se vyskytovali diploidní a triploidní jedinci i celosamičí populace.

5.1 Ověření druhového statusu sivenů a jejich hybridů metodami molekulární genetiky

V intenzivních chovech lososovitých ryb, jmenovitě sivenů, se setkáváme především s chovem sivena amerického (*S. fontinalis*), sivena arktického neboli sivena severního (*S. alpinus*) a jejich hybrida sivena alsaského (*S. fontinalis* x *S. alpinus*; Sparctic charr, Elsässer Saibling; Reiter 2006). V evropských chovech se můžeme rovněž setkat i s výskytem sivena alpského neboli sivena evropského či sivena umbla (*Salvelinus umbla*) a jeho křížence (*S. fontinalis* x *S. umbla*) a sivena obrovského (*Salvelinus namaycush*), včetně jeho kříženců (*S. namaycush* x *S. fontinalis*, *S. namaycush* x *S. alpinus* (Aufsesser Saibling) a *S. namaycush* x *S. umbla*). Současná druhová determinace je založena především na morfologických charakteristikách, které nejsou vždy průkazné, a v případě kříženců různých filiálních generací zcela selhávají (Gross et al., 2004). Identifikace je často subjektivní a založená především na důvěře ke zdroji, od kterého je chovný materiál pořizován. Tento klasický postup může být zatížen chybou, kterou nemusí chovná zařízení vůbec odhalit. V 90. letech minulého století byly v ČR učiněny pokusy identifikovat variabilitu sivenů pomocí alozymové analýzy, ale nebylo v ní dále pokračováno (V. Šlechta osobní sdělení).

Značné zpřesnění a zvýšení spolehlivosti v identifikačním procesu poskytuje nová kombinovaná technika složená z polymerázové řetězové reakce (PCR), restriční techniky PCR-RFLP a sekvenování. První z těchto metod vychází z primerového designu autorů Chow & Hazama (1998), ovšem neamplifikuje celý 1. intron S7 r-proteinu (cca 900 bp), ale jen jeho menší diagnostickou část nazvanou hypervariabilní oblast Johanna Gregora Mendela (JGM region, 524 - 589 bp). Nově navržený design unikátních primerů a výskyt diagnostických indelů vymezuje druhově specifickou délku tohoto regionu, který je následně vizualizován buď na agarózovém gelu nebo na kapilární elektroforéze. Druhá metoda skenuje pomocí aplikace dvou restričních systémů unikátní druhově-specifické motivy v JGM regionu a vzniklé restriční vzory (RE vzory) tak ještě více zpřesňují druhovou a hybridní identifikaci. V mnoha případech postačí jedna z uvedených metod, ovšem ve složitějších případech, je kombinace obou metod nezbytná. V případě rozlišení druhu *S. umbla* od *S. alpinus*, je nezbytné využít i Sangerovu sekvenáčnickou techniku, pokud není využíváno automatické separace na přístroji Fragment AnalyzerTM. Tuto třetí metodu lze současně využít i pro potvrzení všech homozygotních, heterozygotních a hybridních variant. Celé determinační schéma je podstatně zjednodušeno zařazením přístroje Fragment AnalyzerTM pro automatickou separaci fragmentů na kapilární elektroforéze. Je zde zohledňován zájem chovatele, kde vedle nízkých determinačních nákladů je kladen důraz i na rychlost laboratorního potvrzení a jeho spolehlivost. Spolehlivá a rychlá identifikace napomáhá zabránit ekonomickým ztrátám v intenzivních chovech ryb a současně ještě na úplném počátku chovného řetězce odhalit druhové falšování či neúmyslné záměny nebo jen nesprávnou manipulaci při jednotlivých krocích chovného procesu.

Celý proces identifikace čtyř druhů sivenů a jejich hybridů je podrobně popsán v již vydané certifikované metodice:

Mendel, J., Halačka, K., Mareš, J., 2017, Využití polymerázové řetězové reakce, PCR-RFLP techniky a sekvenční analýzy k determinaci homozygotů, vnitrodruhových heterozygotů a mezidruhových hybridů rodu *Salvelinus* v chovných zařízeních. Metodika R15/2017, MENDELU, 24 s. ISBN 978-80-7509-514-5

5.2 Ověření liniové příslušnosti pstruha duhového metodami molekulární genetiky

Pro ověřování příslušnosti k plemenu či linii byl použit genotypizační přístup založený na polymorfismu STR lokusů (short tandem repeat). Byla vyvinuta a otestována na vzorcích evropských chovů zcela unikátní STR sada, nazvaná „OMY panel“. Tato identifikační sada se skládá z několika multiplexů, které jsou tvořeny 5 - 6 polymorfními jadernými lokusy o rozličné délce alel. V současnosti probíhá proces právní ochrany, na jehož konci budou v roce 2020 uvedeny na trh dvě její varianty: standardní sada OMY12 a komplexní sada OMY17. Nyní je již k dispozici menší varianta OMY9, která je nabízena chovatelům v rámci DNA servisu poskytovaném Ústavem biologie obratlovců v. v. i. AV ČR.

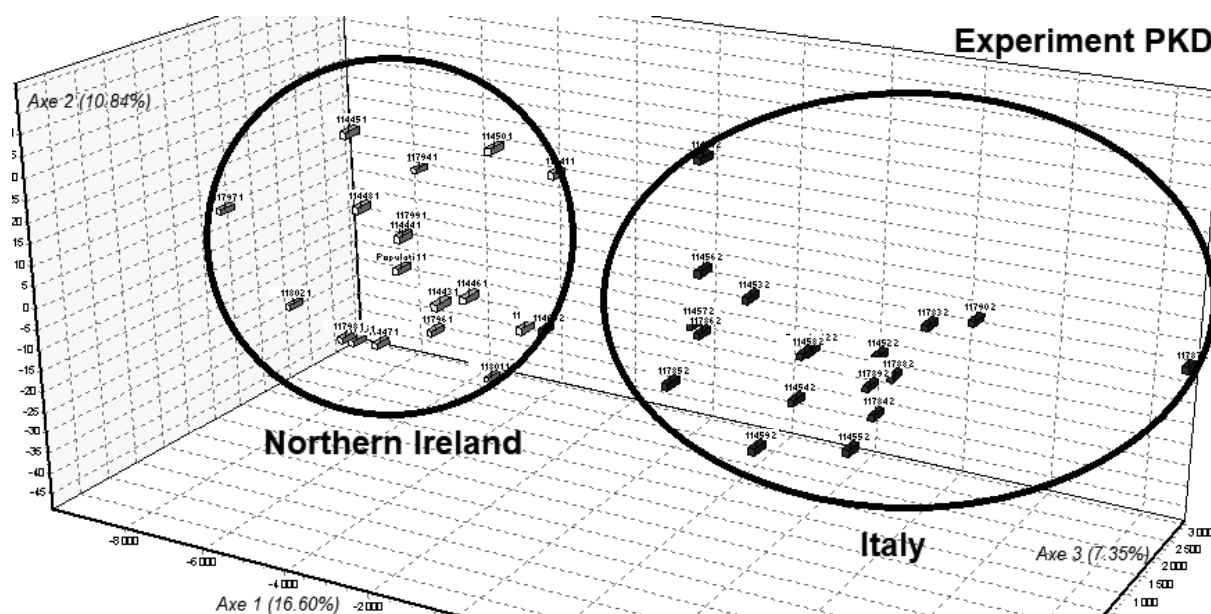
Ověřovací přístup OMY9 vychází z PCR amplifikace 9 mikrosatelitových lokusů, jejichž polymorfní status byl ověřen na 25 chovných zdrojích v Evropě. Tyto STR lokusy jsou soustředěny do dvou multiplexů M1 a M2 a detailnější popis uvádí Tab. 1.

Tabulka 1. Profil OMY9 panelu pro determinaci chovných zdrojů pstruha duhového

Multiplex	Lokus	Primer μM	Teplota annealingu (°C)	ABI značení	Opakující se motiv	Délka alel	Primery*
M1	A1	0,15	55	6-FAM	dinukleotid	92-124	Mendel et al. 2018c
M1	A2	0,15	55	VIC	trinukleotid	114-141	Mendel et al. 2018c
M1	A3	0,15	55	6-FAM	trinukleotid	255-273	Mendel et al. 2018c
M1	A4	0,15	55	NED	dinukleotid	152-194	Mendel et al. 2018c
M1	A5	0,2	55	PET	dinukleotid	266-278	Mendel et al. 2018c
M2	B1	0,2	55	PET	tetranukleotid	167-179	Mendel et al. 2018c
M2	B2	0,2	55	VIC	dinukleotid	113-147	Mendel et al. 2018c
M2	B3	0,2	55	6-FAM	tetranukleotid	216-276	Mendel et al. 2018c
M2	B4	0,2	55	6-FAM	tetranukleotid	108-112	Mendel et al. 2018c

*Sekvence značených i neznačených primerů jsou součástí identifikační soupravy OMIdent

Mikrosatelitová analýza pro determinaci původu pstruha duhového byla prováděna na přístroji Mastercycler pro (Eppendorf). Každý vzorek byl amplifikován v reakčním objemu 10 μ l obsahující 1 μ l DNA templátu, 5 μ l Qiagen Multiplex PCR kitu a konkrétního množství příslušného primerového páru (viz Tab. 1), přičemž každý forward primer byl označen na 5' konci fluorescenčním barvivem (Applied Biosystems). PCR byla prováděna v reakčním profilu: 27 cyklů denaturace 30 s v 94 °C, annealingu 90 s v 55 °C a extenze 60 s v 72 °C. Předcházela 15 min iniciační denaturace v 95 °C a následovala 30 min terminační extenze v 60 °C. Poté 1 μ l PCR produktu byl přidán do směsi velikostního standardu GeneScan LIZ600 v2 (Applied Biosystems) a formamidu. Směs byla denaturována a analyzována na přístroji ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). DNA fragmenty byly vyhodnocovány pomocí softwaru GENEMAPPER version 3.7 (Applied Biosystems). Determinační STR profil obou zkoumaných linií – odolné ze Severního Irska a vnímavé k PKD z Itálie zobrazuje souhrnně 3D PCA graf (Obr. 1).



Obr. 1. Analýza hlavních komponent (PCA) prováděná pomocí softwaru GENETIX 4.05 (Belkhir et al., 1996-2004) založená na OMY9 panelu. Genotypy severo-irské linie - 18 jedinců (žlutý symbol) a italské linie - 18 jedinců (modrý symbol).

Pro spolehlivou determinaci jednotlivých chovných zdrojů a plemen je Ústavem biologie obratlovců dále konstruován e-modul Akvakultura, který je součástí vyvíjeného softwaru S7iFish. Soustřeďuje rozsáhlou STR databázi v Evropě dostupných linií/plemen sivenů a pstruha duhového, včetně rozličných nástrojů pro geneticky kontrolovaný chov a chovný management. V současnosti je možné jej využívat formou DNA servisu poskytovaný Ústavem biologie obratlovců, v. v. i. Od roku 2020 bude dostupná i forma placeného přístupu zvenčí pro chovná zařízení.

Procesy ověřování druhové a liniové příslušnosti zmiňovaných taxonů byly soustředěny do jednotné sady technik nazvané „SALMONID“, kterou chovatelé již mohou využívat v rámci DNA servisu poskytovaném Ústavem biologie obratlovců v. v. i. AV ČR (Mendel et al., 2018b, c, d).

Níže uvádíme konkrétní příklady využití sady SALMONID:

- metoda určení 4 druhů sivenů a jejich hybridů
- potvrzení národního genetického zdroje (Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat, MZE)
- stanovení čistoty plemene (linie, populace)
- vyloučení/potvrzení meziliniálních heterozygotů a mezidruhových hybridů
- posouzení aktuální genetické variability chovu/plemene
- výběr vhodných partnerů v křížení (stanovení biodiverzitního koeficientu)
- vyhodnocení trendu úrovně příbuzenského křížení v chovu (inbrídingu)
- stanovení koeficientu genetické vzdálenosti/příbuznosti plemen/zdroje
- kontrola a ověření správnosti zdroje chovného materiálu a rezistentní linie
- genetické posouzení vhodnosti nových zdrojů pro obnovu kmenového hejna
- určení pohlaví
- ověření přítomnosti/nepřítomnosti 3n jedinců v zařízení
- ověření přítomnosti celosamičích populací

Genetický toolbox pro chovatele lososovitých ryb souhrnně obsahuje – certifikovanou metodiku na určení 4 druhů sivenů a jejich hybridů, e-modul Akvakultura (databáze STR lokusů rodů *Salvelinus* a *Oncorhynchus*), balíček služeb SALMONID (UBO DNA servis) a komerční identifikační soupravy OMY12 a OMY17 (souhrnně „OMident“), které budou k dispozici široké veřejnosti v roce 2020. V současnosti probíhá proces právní ochrany a tvorby prototypů. Všechny ověřovací techniky jsou již nyní k dispozici pro chovatele formou DNA servisu Ústavu biologie obratlovců v. v. i., Květná 8 Brno, ČR.

6. Ověření různé druhové a liniové odolnosti vůči vybraným onemocněním

6.1. Ověření různé druhové a liniové odolnosti lososovitých ryb vůči proliferativnímu onemocněním ledvin

Proliferativní onemocnění ledvin

Proliferativní onemocnění ledvin (PKD) je závažné onemocnění, které může způsobovat vážné ekonomické ztráty v chovech lososovitých ryb. Vyskytuje se v intenzivních chovech i ve volných vodách na celé severní polokouli. V současné době patří v Evropě mezi jedno z nejzávažnějších onemocnění lososovitých ryb. Klimatické změny související se zvýšením teploty zvyšují prevalenci onemocnění a jeho rozšíření (Mo a Jørgensen, 2017). V našich podmínkách bývá morbidita u vnímavé obsádky většinou 100 % a mortalita ryb v intenzivních chovech spojená s PKD se pohybuje kolem 30 % (Palikova a kol., 2017). Pokud se přidruží sekundární infekce či stres, může být mortalita mnohem vyšší.

Původcem onemocnění je *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Malacosporea). Jedná se o organismus vyznačující se dvojhospitelským životním cyklem, v němž mechovky jsou primárními hostiteli a ryby příležitostnými konečnými hostiteli. V mechovkách i v jejich klidových stádiích – statoblastech – je *T. bryosalmonae* přítomna po celý rok, ale k uvolňování infekčních spor dochází zejména na jaře a v létě, kdy je teplota vody vyšší než 12 °C (Bettge a kol., 2009). Z mechovek jsou infekční stádia uvolňována do vody.

Za vnímavé druhy jsou považovány lososovité ryby: pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), pstruh obecný (*Salmo trutta*), siven americký (*Salvelinus fontinalis*), lipan podhorní (*Thymalus thymalus*) a další. Je popisována rozdílná mezidruhovná, ale i meziliniiová vnímavost (Grabner a kol., 2009). Nejvnímavějším druhem se jeví pstruh duhový (Clifton-Hadley, 1984).

Zdrojem infekce je voda obsahující spory uvolněné z mechovek - malakospory. Malakospory pronikají do krevního oběhu přes kůži nebo přes žábry a jsou krví roznášeny po těle.

Mezi podmiňující faktory patří věk ryb: nejvnímavější je roček lososovitých ryb. Dalším podmiňujícím faktorem je teplota vody nad 12 °C, která souvisí s uvolňováním spor z mechovek.

Postižené ryby jsou apatické a nepřijímají potravu. Při makroskopickém vyšetření ryb zjišťujeme zvětšenou dutinu tělní, exoftalmus, přítomnost hemoragií v kůži a anemii žaber. Při pitvě zjišťujeme ascites, zvětšenou slezinu, zvětšení ledvin zejména v jejich kaudální části, anemii jater.

Diagnóza je založena na posouzení patologických změn a na histologickém průkazu původce v ledvinách, případně v dalších orgánech. Pro prokázání původce je možné použít komerčně dostupné monoklonární protilátky (AquaMAb-P01, Aquatic Diagnostics) a histologické řezy obarvit imunohistochemicky (IHC); (Adams a kol., 1992). Původce je možné rovněž detekovat pomocí molekulárních metod.

6.1.1. Ověření různé druhové odolnosti lososovitých ryb vůči PKD

V roce 2015 bylo v RAS odebráno 50 vzorků ledvin od lososovitých ryb: siven americký (*Salvelinus fontinalis*) dvouroček – 10 vzorků, kříženec sivena amerického a sivena arktického (*Salvelinus alpinus*) dvouroček – 10 vzorků, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) – 30 vzorků ročků a dvouročků (dvouročci chovaní na RAS 1. a 2. rok). Ryby, které byly na systému již druhý rok, se s patogenem setkaly opakovaně. Ryby byly usmrceny, byly posouzeny patologicko-anatomické změny a odebrány vzorky pro laboratorní vyšetření. V laboratoři bylo odebráno malé množství tkáně (do 25 mg) ze všech vzorků ledvin pro homogenizaci a extrakci DNA pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu (QIAGEN) na základě protokolu od výrobce. Získaná DNA byla využita do polymerázové řetězové reakce (PCR) pro kvalitativní otestování přítomnosti *T. bryosalmonae*. PCR produkty byly separovány pomocí gelové elektroforézy a vizualizovány pod UV světlem. Dále bylo provedeno kvantitativní vyšetření pomocí qRT-PCR. (Tab. 1).

Tabulka č. 1. Patologicko-anatomický nález (průměrné hodnoty u n jedinců: stupnice 0-4, kdy 0 = žádné změny, 4 = největší změny) a identifikace původce v ledvinách pomocí IHC

(průměrný počet původců v zorném poli mikroskopu při zvětšení 200x), konvenční PCR a kvantitativní PCR (qPCR) v roce 2015; +/n = pozitivní jedinci/vyšetření jedinci.

Druh	PA nález (+/n)	IHC počet (+/n)	PCR (+/n)	qPCR (+/n)
<i>O. mykiss</i> roček	3,1 10/10	138,7±57,1 10/10	8/10	22,0±2,8 10/10
<i>O. mykiss</i> dvouroček (1.rok RAS)	2,0 9/10	43,4±53,9 5/10	0/8	29,2±5,3 7/10
<i>O. mykiss</i> dvouroček (2.rok RAS)	0,9 6/10	0 0/10	1/10	31,5±1,5 4/10
<i>S. fontinalis</i> dvouroček (1.rok RAS)	0,2 1/10	0 0/10	8/10	32,6±2,5 6/10
kříženec dvouroček (2.rok RAS)	negativní	1,65±1,1 2/10	2/10	31,8±2,1 9/10

Bylo potvrzeno, že siven americký a kříženci jsou odolní vůči PKD; parazit byl sice u většiny vyšetřovaných ryb molekulárně detekován, a tudíž přítomen, ale patologické změny se, až na jednu výjimku, nevyskytovaly. Z těchto výsledků je vidět, že i když je parazit *T. bryosalmonae* v těle ryby přítomen, nemusí se nemoc klinicky projevit, to znamená, že původce nemusí u odolných druhů působit výrazné patologické změny. Výrazné patologicko-anatomické změny byly zachyceny v různém rozsahu u pstruha duhového. Ryby, které se s patogenem setkaly podruhé, měly výrazně menší patologicko-anatomický nález.

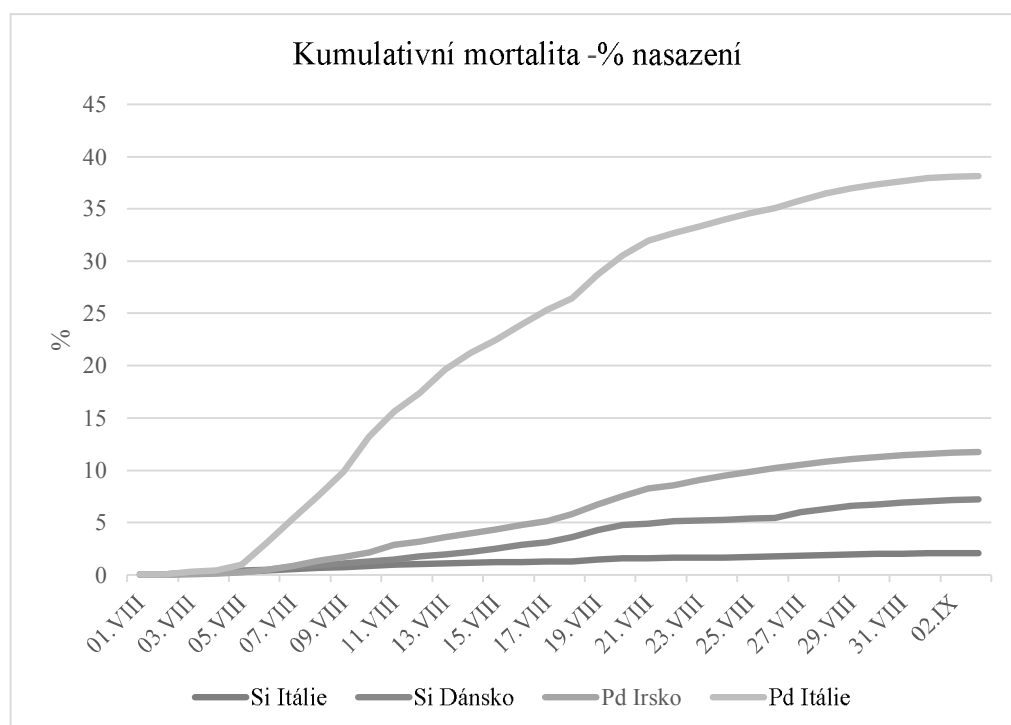
6.1.2. Ověření různé liniové odolnosti lososovitých ryb vůči PKD

V roce 2017 bylo vyšetřeno 40 ryb: siven americký (*Salvelinus fontinalis*), původem z Itálie – 10 ryb, siven americký (*Salvelinus fontinalis*), původ Dánsko – 10 ryb, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), původ Severní Irsko – 10 ryb, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), původ Itálie – 10 ryb. Ryby byly humánně usmrceny, byly posouzeny patologicko-anatomické změny a z každé ryby byl odebrán vzorek ledvinné tkáně pro imunohistochemické vyšetření (IHC) a pro vyšetření pomocí molekulárně biologických metod. Ledvinná tkáň byla zhomogenizována a byla z ní vyextrahována DNA pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu (QIAGEN, Německo) na základě protokolu od výrobce. Dále byla změřena koncentrace každé vyizolované DNA pomocí hmotnostního spektrofotometru a následně byly tyto vzorky DNA využity pro kvalitativní polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pro detekci přítomnosti parazita *T. bryosalmonae* (Kent et al., 1998). PCR produkty byly separovány pomocí gelové elektroforézy a vizualizovány pod UV světlem. PCR produkty byly vyizolovány z gelu a zaslány na osekvenování k potvrzení, že se skutečně jedná o DNA sledovaného původce. Dále bylo provedeno kvantitativní vyšetření přítomnosti tohoto parazita pomocí real-time PCR (Bettge et al., 2009). Výsledky patologického-anatomického nálezu, imunohistochemického a molekulárního vyšetření jsou uvedeny v Tab. 2. U rybí obsádky byla průběžně zaznamenána mortalita ryb spojená s PKD a následně byla vyhodnocena kumulativní mortalita (Graf 1).

Tabulka č. 2. Patologicko-anatomický nálezn u vyšetřených ryb (průměrné hodnoty n jedinců: stupnice 0–4, kdy 0 = žádné změny, 4 = největší změny), výsledky IHC (průměrný počet původců v zorném poli mikroskopu při zvětšení 200x), výsledky kvalitativní PCR a kvantitativní real-time PCR (qPCR); +/-n = pozitivní jedinci/vyšetření jedinci.

	PA nálezn (+/n)	IHC počet (+/n)	PCR (+/n)	qPCR (+/n)
pstruh duhový původ S. Irsko	0,5 7/10	0,9±0,7 3/9	10/10	31,2±2,9 8/10
pstruh duhový původ Itálie	2,8 10/10	14,0±12,7 3/4	8/10	26,3±5,1 9/10
siven americký původ Itálie	negativní	0 0/10	8/10	30,6±2,1 8/10
siven americký původ Dánsko	0,15 2/10	0,4±0,2 2/10	10/10	29,6±2,9 9/10

Graf č. 1. Kumulativní mortalita linií pstruha duhového a sivena amerického



Výsledky potvrdily, že existují rozdíly nejen v druhové, ale i liniové odolnosti lososovitých ryb k onemocnění PKD. Odlišná liniová vnímavost vůči PKD byla zjištěna zejména u pstruha duhového. Jako prokazatelně odolnější vůči PKD se jeví pstruh duhový původem ze Severního Irsko. U sivena amerického byl mezi liniemi také zjištěn rozdíl ve vnímavosti, ale ne tak výrazný. U sivena amerického byly zaznamenány nevýrazné patologicko-anatomické změny v ledvinách pouze u dvou vzorků ryb původem z Dánska, ale PCR potvrdila

přítomnost parazita téměř u všech kusů. Výsledky real-time PCR ukazují kvantitativní variabilitu patogenu v ledvinné tkáni.

6.1.3. Závěr

Bylo potvrzeno, že existují rozdíly v odolnosti lososovitých ryb vůči PKD nejen v rámci jejich druhů, ale i v rámci jednotlivých linií. Výběrem těchto vhodných druhů a linií pro chov v intenzivní akvakultuře, kde není možné zamezit zavlečení původce PKD, lze minimalizovat ekonomické ztráty způsobené tímto onemocněním.

6.2. Ověření různé druhové a liniové odolnosti vůči furunkulóze lososovitých ryb

6.2.1. Furunkulóza

Furunkulóza je závažné onemocnění ryb známé více než 100 let. Vyskytuje se v intenzivních chovech i ve volných vodách na celém světě s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu. Ačkoliv název onemocnění vychází z přítomnosti typických hlubokých kožních vředů – furunklů vznikajících při chronickém průběhu onemocnění, chronický průběh ani tvorba furunklů není nejčastější formou onemocnění. Původcem onemocnění je obligátní patogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Mezi vnímavé druhy patří lososovité ryby. Vnímavost je však různá. Za nejvnímavější druh je uváděn pstruh obecný (*Salmo trutta*) a siven americký (*Salvelinus fontinalis*), naopak pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) je odolnější. Vnímavý je i lipan podhorní (*Thymalus thymalus*) a další druhy lososovitých ryb. Vnímavost se liší i mezi druhovými liniemi v závislosti na genetickém původu ryb (Marsden a kol., 1996).

Do vodního prostředí se bakterie dostávají s nemocnými rybami, s kontaminovanou vodou nebo rybolovným nářadím. Významnou úlohu v přenosu původce hrají i nosiči - vektorů, mezi které patří ryby i jiní vodní živočichové včetně parazitů. Významným faktorem pro šíření infekce je existence skryté formy onemocnění, kdy se přítomnost patogenu neprojevuje klinickými příznaky (Plehn, 1911). Takovéto ryby mohou sloužit jako přenašeči. K propuknutí onemocnění u ryb se skrytou – latentní formou může dojít vlivem stresu.

Jako hlavní faktor podmiňující vzplanutí onemocnění je uváděna vyšší teplota vody (obvykle nad 16 °C), proto se výskyt onemocnění vyznačuje jistou sezónností vrcholící v pozdním jaře a v létě. Vyšší teplota ovlivňuje nejenom rozvoj původce, ale působí i stresově na ryby. Podobně působí i náhlé změny teploty. Ryby jsou více vnímavé k furunkulóze rovněž v období tření. Mezi další podmiňující faktory je uváděn i věk ryb. U plůdku a mladých věkových kategorií onemocnění probíhá rychleji a může být doprovázeno vysokou mortalitou ryb zejména v akvakulturních chovech. Rozvoji onemocnění napomáhá i vyšší organické zatížení vody, vyšší hustota rybí obsádky, přítomnost jiných patogenů a stres.

Onemocnění se vyskytuje v několika formách. Perakutní forma je typická pro plůdek, ryby hynou rychle a ve velkém množství. Akutní forma postihuje juvenilní a dospělé ryby a je charakterizována septikémií, bakterie je krví roznášena do všech orgánů, ryby obvykle hynou za 2–3 dny, mortalita bývá rovněž vysoká. Subakutní a chronický průběh se vyvíjí u starších ryb nebo u ryb vykazujících větší vrozenou odolnost a je doprovázen vznikem abscesů ve svalovině a jejich provalením navenek ve formě hlubokých kožních vředů podobných furunklům. Mortalita je nízká a ryby mohou onemocnění přežít.

Suspektní diagnóza je založena na posouzení podmiňujících faktorů, epizootologické situace, na posouzení klinických a patologických změn. Potvrzení diagnózy vyžaduje izolaci a identifikaci původce. Kultivace se provádí na běžných médiích. Původce se kultivuje přednostně z ledvin, případně z abscesů nebo kožních lézí. Identifikaci lze provést rovněž molekulárními metodami.

K léčbě furunkulózy se používají antimikrobiální látky. V případě potřeby rychlého zákroku lze použít širokospektrá antibiotika. Původce bývá citlivý vůči potencovaným sulfonamidům, tetracyklinům, chinolonům, amoxicilinu a florfenicolu. Vzhledem k existujícím rezistencím je ale vhodné aplikovat antibiotika až po předchozím stanovení citlivosti bakterií.

V ohrožených chovech je vhodné nasazovat odolnější lososovité druhy, resp. linie ryb.

6.2.2. Ověření různé druhové odolnosti sivenů vůči furunkulóze lososovitých ryb

Vnímavost lososovitých ryb vůči furunkulóze je různá. Za nejvímavější druh je uváděn pstruh obecný a siven americký, pstruh duhový je odolnější (Cypriano a Heartwell, 1986). Cílem našeho experimentu bylo zjistit, zda existují rozdíly ve vnímavosti i mezi různými druhy sivenů.

Různé druhy sivenů (siven americký - *Salvelinus fontinalis*, siven obrovský - *S. namaycush* a kříženci sivenů) byly podrobeny experimentální infekci *Aeromonas salmonicida* v dávkách 10^2 , 10^3 a 10^4 CFU na rybu. U ryb bylo sledováno přežití a přeživším rybám byla po třech týdnech po aplikaci nejvyšší dávky bakterií odebrána krev na vyhodnocení vybraných imunitních parametrů (celkový počet leukocytů, diferenciální počet leukocytů, fagocytární aktivita fagocytů periferní krve, aktivita komplementu, hladina celkových imunoglobulinů krevní plasmy a titer specifických protilátek) a poté byly ryby usmrceny. Následně byl vyhodnocen získaný profil imunitní odpovědi u jednotlivých druhů ryb. Experiment probíhal v teplotním rozmezí vody 15 – 17 °C, pH vody bylo 7,6 – 8,3, sycení kyslíkem nad 90 %. Průměrná hmotnost ryb při ukončení experimentu byla (průměr ± SD): siven americký $33,3 \pm 8,3$ g, kříženci $23,9 \pm 9,6$ g, siven obrovský $10,8 \pm 4,3$ g.

Výsledky

Během třítydenní pozorovací doby došlo k úhynům dvou kusů kříženců s aplikací nejvyšší dávky bakterií a dvou kusů sivenů obrovských s nejvyšší dávkou bakterií a jednoho kusu s dávkou 10^3 CFU. Siven americký neuhynul žádný.

Výsledky vyhodnocených imunitních a hematologických parametrů jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka č. 1. Celkové počty červených a bílých krvinek (průměr ± SD).

	Celkový počet erytrocytů (T.l ⁻¹)	Celkový počet leukocytů (G.l ⁻¹)
Siven americký n=10	0,84 ± 0,21 ^B	35,0 ± 10,6
Kříženec n=8	0,85 ± 0,21 ^B	32,0 ± 13,3
Siven obrovský n=8	0,52 ± 0,11 ^A	25,3 ± 8,5

Tabulka č. 2. Imunitní parametry (průměr ± SD).

	Oxidativní vzplanutí – integrál CHL (RLU . s)	Celkové imunoglobuliny (mg . ml ⁻¹)	Titř specifických protilátek	Aktivita komplementu (min ⁻¹)
Siven americký n=10	477810 ± 192324 ^A	22,3 ± 3,8	0,23 ± 0,07 ^B	95,6 ± 3,3
Kříženec n=8	1251333 ± 873063 ^{AB}	21,6 ± 2,2	0,22 ± 0,07 ^b	93,5 ± 4,2
Siven obrovský n=8	989916 ± 386255 ^B	23,4 ± 5,0	0,14 ± 0,02 ^{Aa}	97,4 ± 4,4

Z těchto výsledků je patrný jistý rozdíl mezi druhy sivenů v reakci na experimentální infekci *A. salmonicida*. I když ryby byly stejného stáří, byly mezi nimi patrné hmotnostní a velikostní rozdíly. Zvýšená mortalita u kříženců a zejména u sivenů obrovských mohla být způsobena právě menší velikostí ryb. Nicméně ze sledovaných imunitních parametrů je patrné, že siven americký, u kterého nedošlo k žádnému úhynu, vykazoval po třech týdnech od aplikace nejvyšší titř protilátek proti *A. salmonicida*, což svědčí pro lepší reakci specifického imunitního systému a potažmo o vyšší odolnosti oproti křížencům sivenů a sivenu obrovskému vůči tomuto onemocnění.

6.2.3. Ověření různé liniové odolnosti pstruha duhového vůči furunkulóze lososovitých ryb

Cílem experimentu bylo zjistit, zda dvě geneticky odlišné linie (jedna původem z Itálie, druhá původem ze Severního Irsku) vykazující různou odolnost vůči PKD, budou vykazovat i odlišnou vnímavost vůči furunkulóze lososovitých ryb.

Ryby obou linií byly podrobeny v laboratorních podmínkách experimentální infekci *A. salmonicida*. Bakteriální suspenze byla aplikována intraperitoneálně. Dávka 0,1 ml obsahovala 5. 10² bakterií na jednu rybu. Celkem byla experimentální infekce provedena u cca 25 ks ryb od každé linie. Průměrná hmotnost ryb linie z Itálie byla 182 ± 42 g, u linie z Irsku 194 ± 49 g. Ryby byly po experimentální infekci skupinově označeny, umístěny do laminátové nádrže o objemu 1 m³ a odchováány po dobu 8 týdnů při teplotě 15 °C. Ryby byly krmeny komerční krmnou směsí pro lososovité ryby. Po 6 týdnech od aplikace bylo odebráno z každé skupiny po osmi kusech ryb. Těmto rybám byla odebrána krev pro zjištění titru specifických protilátek proti *A. salmonicida*. Ukončení pokusu bylo po osmi týdnech. Po celou dobu bylo sledováno chování ryb a zaznamenávány úhyny ryb. U uhynulých ryb i u ryb usmrčených po skončení experimentu byla provedena kultivace ze sleziny na krevní agar. V krvi usmrčených ryb byl stanoven celkový počet leukocytů, oxidativní vzplanutí fagocytů

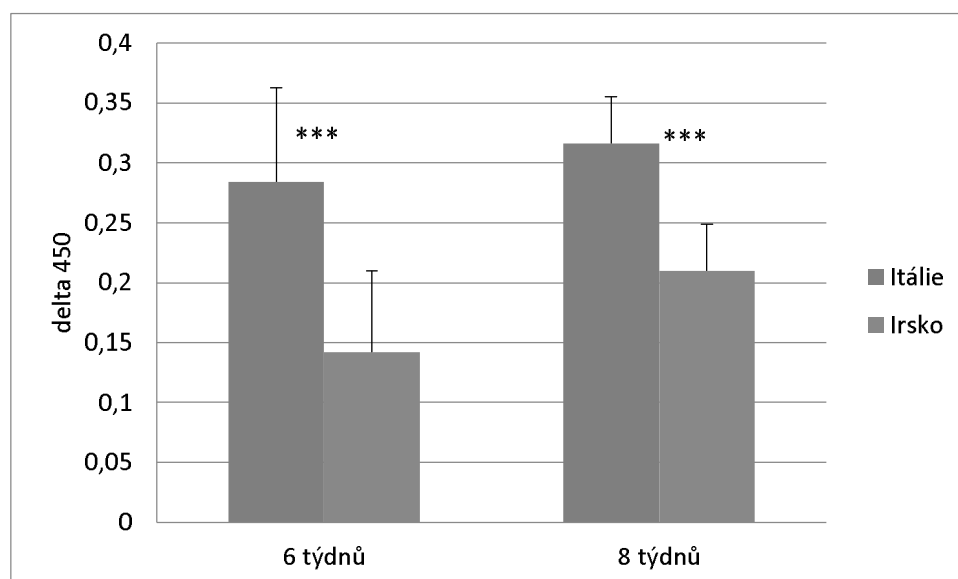
(chemiluminiscenčně po aktivaci opsonizovaným zymozanem). V plasmě ryb byla dále stanovena koncentrace celkových imunoglobulinů (srážecí metoda síranem zinečnatým), bakteriolytická aktivita komplementu (chemiluminiscenčně s využitím bioluminiscenčního kmene *Escherichia coli*) a titer specifických protilátek proti *A. salmonicida* (ELISA metoda).

Výsledky

Během testu došlo k úhynu 1 ks pstruha duhového původem z Itálie a dvou ks pstruha duhového původem z Irska. Ke všem úhynům došlo až s více než měsíčním odstupem od experimentální infekce a při kultivaci ze sleziny nebyl ani v jednom případě izolován původce furunkulózy. Furunkulózu nelze tudíž považovat za příčinu úhynů těchto ryb.

V rámci sledovaných parametrů byl shledán statisticky vysoce významný rozdíl pouze v titru specifických protilátek. V žádném dalším sledovaném parametru nebyly nalezeny meziliniové rozdíly. Rozdíly v titru specifických protilátek jsou uvedeny v následujícím grafu.

Titr specifických protilátek proti *Aeromonas salmonicida*.



6.2.4. Závěr

Na základě provedeného infekčního experimentu lze konstatovat, že infekční dávka nebyla dost vysoká k vyvolání klinického onemocnění spojeného s hynutím ryb. K tomu mohla přispět i teplota vody, která nebyla optimální pro vzplanutí onemocnění, ale byla vhodná pro imunitní reakci hostitele, což se odrazilo ve zvýšení titru specifických protilátek po šesti i osmi týdnech. Z těchto výsledků je patrné, že linie pstruhů duhových původem z Itálie reagovala výrazně vyššími titry specifických protilátek a jeví tudíž vyšší odolnost vůči furunkulóze. V porovnání s vnímavostí vůči proliferativnímu onemocnění ledvin (PKD) je to tedy situace odlišná: linie vykazující vyšší odolnost vůči PKD (původ Irsko) je více vnímavá k furunkulóze.

Pro chov, ve kterém se vyskytují problémy s oběmi onemocněními, je tedy nutné zvážit využití vhodných linií ve vztahu k porovnání ztrát působených původci těchto onemocnění a k přihlídnutí k možnostem jejich tlumení, tj. likvidace mechovek a/nebo správný management nasazování ryb do infikovaného systému u PKD vs. použití antimikrobiálních látek a/nebo vakcinace a imunostimulace u furunkulózy.

7. Produkční výsledky chovu vybraných druhů a linií lososovitých ryb

7.1. Porovnání produkčních parametrů vybraných skupin lososovitých ryb v provozních podmínkách

V průběhu roku 2017 byl realizován v provozním zařízení partnera (recirkulační systém „dánského typu“) krmný test zaměřený na zhodnocení produkce lososovitých ryb různého původu. Do testu byl zařazen pstruh duhový různého původu a kříženec sivenů (s. alsaský) jako dva „druhy“ lososovitých ryb perspektivní pro tento objekt. Byla použita 2 komerčně vyráběná krmiva. Testované varianty: porovnání pstruh duhový původem z Dánska a Itálie a siven alsaský, krmivo Biomar 920 ADV a krmivo Skretting, obě krmiva ve velikosti 3 a 4,5 mm.

V rámci realizovaných testů byly hodnoceny následující produkční parametry: úroveň přežití, hodnota krmného koeficientu (FCR), specifická rychlost růstu (SGR) a jejich vzájemný poměr (FCR/SGR), dále délko-hmotnostní parametry pro hodnocení exteriérových ukazatelů (délko-hmotnostní koeficient podle Fultona, Index vysokohřbetosti a širokohřbetosti), složení svaloviny (obsah sušiny, tuku a proteinů).

Var. 1 Si kříženec Itálie	žlab 3 počet ryb 10 tis. krmivo Biomar
Var. 2 Si kříženec Itálie	žlab 4 počet ryb 10 tis. krmivo Skretting
Var. 3 Pd Itálie	žlab 7 počet ryb 10 tis. krmivo Biomar
Var. 4 Pd Itálie	žlab 8 počet ryb 10 tis. krmivo Skretting
Var. 5 Pd Dánsko	žlab 9 počet ryb 10 tis. krmivo Biomar
Var. 6 Pd Dánsko	žlab 10 počet ryb 10 tis. krmivo Skretting

Tab 1. Délko-hmotnostní parametry ryb při zahájení testu

Var.	Dc	Dt	Hmotnost	Fc	Iv	Iš
1	191,25±25,67	163,13±23,97	63,37±26,19	1,29±0,09	5,10±0,35	12,40±1,57
2	209,06±29,79	179,50±29,17	86,99±31,32	1,37±0,10	5,08±0,20	11,72±0,24
3	203,25±23,02	175,13±22,87	89,50±28,18	1,53±0,12	4,35±0,17	12,82±0,73
4	203,38±19,00	175,13±17,90	85,73±20,72	1,51±0,11	4,53±0,30	12,27±0,46

Tab. 2. Délko-hmotnostní parametry ryb při ukončení testu

Var.	Dc	Dt	Hmotnost	Fc	Iv	Iš
1	253,30±26,54	217,63±24,34	167,23±57,99	1,61±0,38	4,73±0,36	12,67±0,94
2	243,30±29,10	209,40±25,78	137,30±47,48	1,50±0,23	4,72±0,38	12,52±1,09
3	275,97±15,48	239,63±14,31	286,97±53,46	2,08±0,12	3,56±0,15	15,22±0,91
4	266,37±17,62	229,97±15,84	250,43±49,24	2,01±0,14	3,67±0,20	14,56±0,83
5	246,50±15,29	215,00±13,64	215,03±42,60	2,25±0,16	3,37±0,14	15,21±1,04
6	239,83±18,02	205,70±15,92	176,30±67,42	2,15±0,14	3,52±0,18	15,37±1,22

Dosažené délko-hmotnostní parametry byly vyšší u krmiva Biomar bez ohledu na sledovaný rybí druh. Obdobně i indexu vyjadřující délko-hmotnostní vztah.

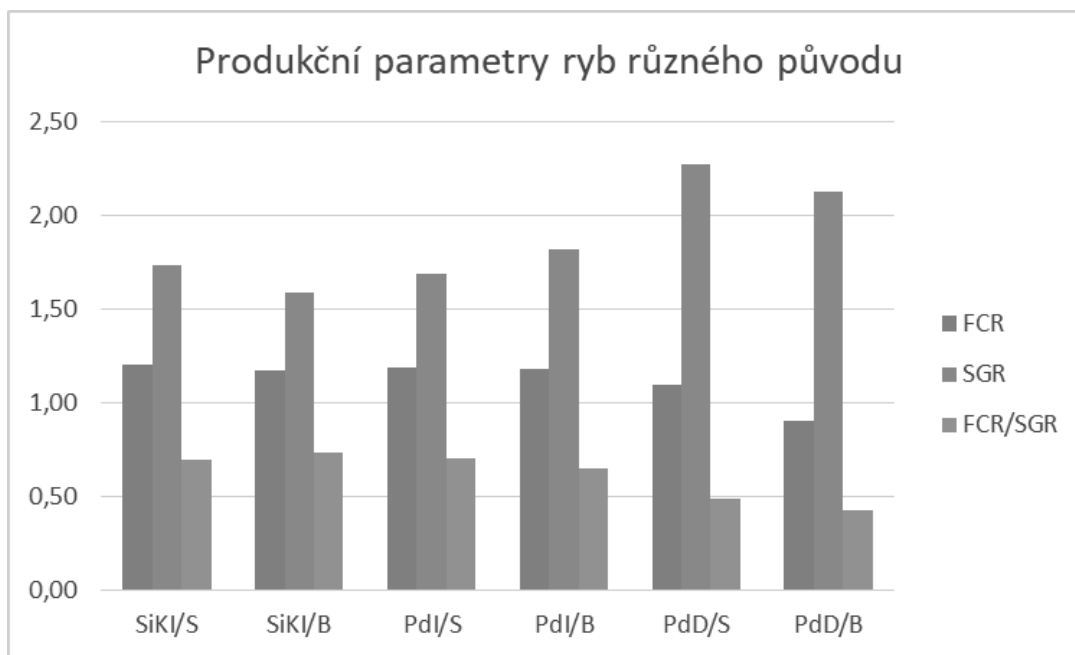
Tab. 3. Složení tkání ryb po ukončení testu.

Var.	Sušina sval	Proteiny ve svalovině	tuk ve svalovině	Sušina celá ryba	proteiny celá ryba	tuk celá ryba
1	28,10±2,82	20,30±1,37	9,04±2,19	32,26±0,62	17,23±0,22	15,76±1,11
2	26,00±1,27	19,37±0,78	7,67±1,30	30,41±1,60	17,67±1,01	12,63±1,38
3	26,18±1,65	19,30±1,15	7,64±1,01	34,01±1,35	16,89±0,55	20,87±3,48
4	24,23±0,25	18,49±0,59	6,37±0,47	32,97±0,48	16,91±0,24	17,27±0,38

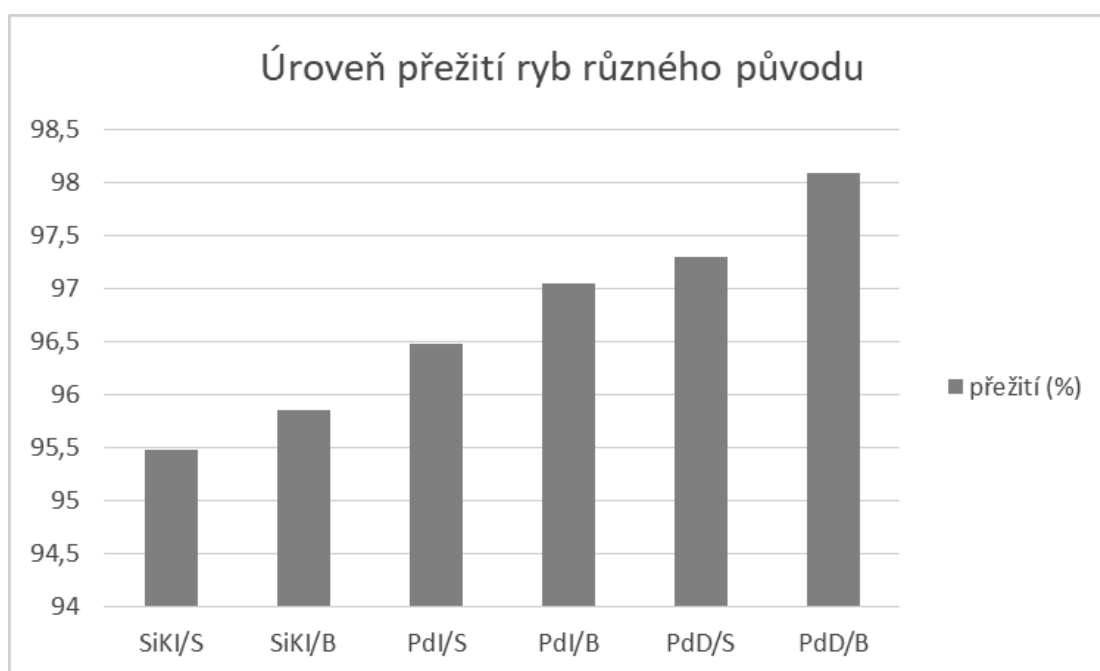
Tab .3. pokračování

Var.	Sušina játra	Tuk játra	Sušina vnitřnosti	Tuk vnitřnosti
1	36,85	27,25	54,39	54,00
2	30,93	16,39	48,25	49,58
3	22,17	5,32	57,56	64,89
4	21,19	4,90	54,41	47,14

Zjištěné rozdíly ve složení tkání nedosáhly statisticky významných rozdílů.



Produkční parametry, zejména hodnota krmného koeficientu (FCR), dosažené u varianty 5 a 6 ve srovnání s var. 3 a 4 byly ovlivněny úrovní přežití jednotlivých skupin ryb. Kdy nejlepší procentické přežití bylo dosaženo u Pd původem z Dánska. Příznivější produkční výsledky byly v tomto zařízení dosaženy u pstruha duhového oproti kříženci sivenů. Při porovnání výsledků dosažených u pstruha duhového, byly lepší hodnoty zjištěny u pstruha duhového pocházejícího z Dánska. Rozdíly mezi použitými krmiva u jednotlivých skupin byly při porovnání jednotlivých parametrů na úrovni 1-18 %, když u pstruha duhové obou původů byly dosaženy příznivější hodnoty u krmiva Biomar. U kříženců sivenů naopak u krmiva Skretting.



Na úroveň přežití mělo použité krmivo jen malý vliv, a to u jednotlivých skupin ryb na úrovni kolem 0,5 %.

7.2. Porovnání produkčních parametrů tří skupiny lososovitých ryb v experimentálních podmínkách

V experimentálním zařízení MENDELU (recirkulační systém) byl proveden test s využitím tří druhů lososovitých ryb. Jednalo se o pstruha duhového, sivena amerického a hybrida s označením siven alsaský. Byly použity 2 komerčně vyráběná krmiva. Tento krmný test byl doplněn hodnocením pouze délko-hmotnostních charakteristik a charakteristikou vnitřního prostředí 4 sivenů (s. americký, arktický, obrovský a kříženců), u kterých z důvodů zdravotních problémů na MENDELU nebyl realizován plánovaný krmný test.

Sledovány byly produkční parametry, délko-hmotnostní a exteriérové ukazatele a složení tkání ryb, obdobně jako u terénního testu.

Testované varianty: porovnání pstruh duhový, siven alsaský a siven americký, krmivo Biomar 920 ADV a Coppens Crystal, obě krmiva ve velikosti 4,5 mm. Délka testu 70 dnů. Ryby byly nasazeny do nádrží o velikosti zhruba 200 l napojených na standardní recirkulaci. Pro každou z variant byly nasazeny 2 nádrže, celkem 30 ks ryb. Krmení 3 x denně, ručně. Krmné dávky v závislosti na velikosti ryb podle doporučení výrobce, kontrolní vážení ve dvoutýdenních intervalech. Sledovány základní fyzikální a chemické parametry. Na začátku testu a na jeho konci individuální měření. Sledované parametry, produkční ukazatele, délko-hmotnostní parametry a složení tkání.

Nasazení variant:

- Var. 1 pstruh duhový počet ryb 2x15 ks . krmivo Biomar
- Var. 2 pstruh duhový počet ryb 2x15 ks . krmivo Coopens
- Var. 3 Siven americký počet ryb 2x15 ks . krmivo Biomar
- Var. 4 Siven americký počet ryb 2x15 ks . krmivo Coopens
- Var. 5 Siven alsaský počet ryb 2x15 ks . krmivo Biomar
- Var. 6 Siven alsaský počet ryb 2x15 ks . krmivo Coopens

Tab. 1. Délko-hmotnostní parametry ryb při zahájení testu

Var.	Dc	Dt	Hmotnost	Fc	Iv	Iš
1	176,37±13,50	149,66±12,21	71,46±16,55	2,10±0,17	3,81±0,24	14,86±1,54
2	180,57±10,22	153,49±10,44	78,06±12,95	2,15±0,17	3,73±0,21	18,82±0,87
3	202,11±25,73	174,06±23,46	103,11±44,53	1,82±0,22	4,51±0,77	13,39±1,39
4	202,37±22,85	174,30±21,28	101,87±44,98	1,79±0,29	4,63±0,49	12,93±1,27
5	221,10±17,73	189,54±16,27	116,53±31,45	1,69±0,16	4,70±0,29	12,79±0,67
6	213,61±18,45	182,61±17,99	104,26±32,48	1,67±0,21	4,67±0,36	12,85±0,92

Tab. 2. Délko-hmotnostní parametry ryb při ukončení testu

Var.	Dc	Dt	Hmotnost	Fc	Iv	Iš
1	250,03±27,99	216,03±26,31	236,03±80,32	2,26±0,24	3,60±0,28	15,28±1,09
2	258,00±20,43	221,3±18,04	246,43±60,48	2,23±0,13	3,69±0,20	14,99±0,63
3	259,45±29,46	226,45±26,85	264,10±94,13	2,18±0,30	3,92±0,40	15,19±1,27
4	249,41±38,50	216,48±3,81	227,93±116,54	2,01±0,37	4,10±0,54	14,37±1,95
5	286,00±29,12	247,52±25,29	302,24±108,62	1,91±0,19	4,16±0,33	14,35±1,20
6	278,32±33,45	240,61±30,42	286,39±111,45	1,95±0,16	4,13±0,32	14,40±0,85

Při hodnocení exteriérových ukazatelů u jednotlivých skupin ryb nebyly zjištěny významné rozdíly.

Tab. 3. Složení tkání ryb po ukončení testu.

Var.	Sušina sval	Proteiny ve svalovině	tuk ve svalovině	Sušina celá ryba	proteiny celá ryba	tuk celá ryba
1	29,27±2,48	19,79±1,01	9,87±1,70	35,13±1,90	16,68±1,83	19,36±1,58
2	27,27±1,37	18,62±1,39	8,59±2,19	35,64±0,92	15,51±0,07	21,26±1,63
3	26,97±0,84	20,19±1,06	6,61±0,28	32,61±0,37	16,54±1,35	16,18±1,73
4	27,95±0,39	19,46±0,97	8,40±1,15	33,95±1,35	16,36±0,66	17,91±0,75
5	31,05±1,61	20,75±0,39	13,69±0,27	33,14±2,54	16,18±0,81	16,02±3,03
6	31,79±2,76	20,30±2,12	12,29±0,32	32,49±2,13	16,44±0,25	15,64±1,95

Tab 3. pokračování

Var.	Sušina játra	Tuk játra	Sušina vnitřnosti	Tuk vnitřnosti
1	27,06	4,46	68,01	58,33
2	29,31	5,48	69,36	65,27
3	28,82	4,33	45,09	42,94
4	35,41	16,00	62,65	34,59
5	40,46	20,17	56,04	46,27
6	46,46	29,25	58,16	56,10

Při porovnání dosažených výsledků bylo zjištěno nejvyšší množství tuku v svalovině a těle ryb u křížence sivenů, nejnižší pak u sivena amerického. Vliv krmiva na obsah tuku v tělních tkáních kolísal mezi jednotlivými variantami a tělními tkáněmi bez shodné tendence.

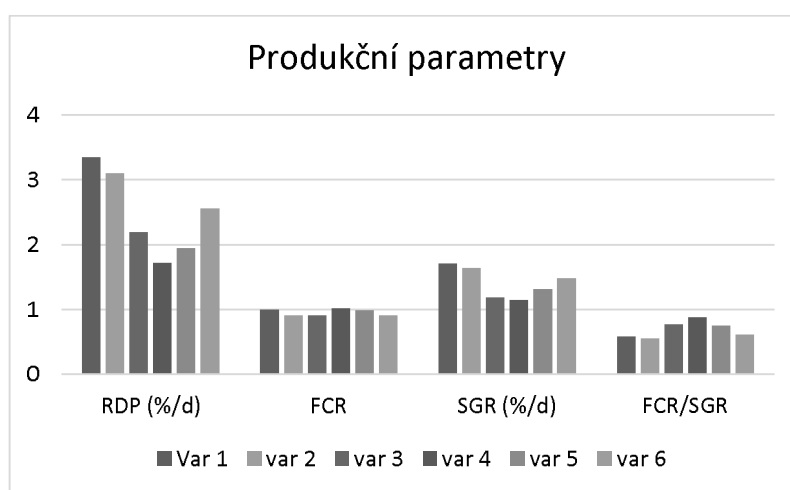
Tab. 4 Vstupní hodnoty

Var.	Hmotnost obsádky (g)	Průměrná kusová hmotnost (g)
1	2100	70,00
2	2310	77,00
3	3285	109,50
4	3000	100,00
5	3513	117,10
6	2986	99,53

Tab. 5 Zhodnocení produkčních parametrů

Var.	Přírůstek (%)	RDP (%/d)	FCR	SGR (%/d)	FCR/SGR	100 % přírůstek (d)
1	238,38	3,35	0,995	1,71	0,581	29,78
2	220,22	3,10	0,907	1,64	0,554	32,24
3	155,89	2,19	0,911	1,19	0,769	45,54
4	122,43	1,72	1,021	1,15	0,884	57,99
5	139,08	1,95	0,994	1,32	0,755	51,05
6	181,55	2,56	0,914	1,48	0,612	39,11

Při porovnání celkových hodnot produkčních parametrů lze konstatovat, že vyšší rychlost růstu bez ohledu na použité krmivo byla dosažena u pstruha duhového. Při porovnání sivenů byly vyšší hodnoty dosaženy u testovaného hybrida v porovnání s čistým druhem sivenem americkým. Pouze u čistého druhu siveny byla dosažena vyšší intenzita růstu s krmivem Coppens v porovnání s krmivem Biomar.



Závěr

Při vyhodnocení realizovaných testů byly nejpříznivější výsledky získány při chovu pstruha duhového, dále kříženců obou druhů sivenů a sivena amerického, horší výsledky u sivena

alpského. Nejméně příznivé zkušenosti byly získány u sivena obrovského. Vliv původu ryb se projevil zejména v hodnocení úrovně přežití při výskytu onemocnění.

8. Novost postupů

Jednotlivé systémy chovu lososovitých ryb jsou vystaveny odlišnému tlaku prostředí a výskytu patogenů. Podle podmínek chovného prostředí lze vybírat, s o hledem na teplotu, její dynamiku, zajištění obsahu rozpuštěného kyslíku, jeho kolísání, hodnoty pH etc. nejvhodnější druh, křížence, linii pro chov v konkrétních podmínkách. Dalším faktorem, který rozhodujícím způsobem ovlivňuje úroveň přežití a tak i ekonomiku chovu, je pak výskyt nejvýznamnějších onemocnění. V rámci této technologie a projektu byla ověřována a vnímavost k onemocnění PKD a furunkulózou. S ohledem na dosažené výsledky pak lze vybrat k chovu odolnou linii. Pro chov, ve kterém se vyskytují problémy s oběma onemocněními, je tedy nutné zvážit využití vhodných linií ve vztahu k porovnání ztrát působených původci těchto onemocnění a k přihlédnutí k možnostem jejich tlumení, tj. likvidace mechovek a/nebo správný management nasazování ryb do infikovaného systému u PKD vs. použití antimikrobiálních látek a/nebo vakcinace a imunostimulace u furunkulózy. S využitím přesné genetické identifikace chovaných nebo nakupovaných ryb lze vybrat pro konkrétní chov vhodné druhy nebo linie. Dále pak využít znalost genetického základu chovaných ryb pro výběr jejich dodavatele.

9. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické a další přínosy vychází z volby vhodného druhu, křížence nebo linie lososovitých ryb k chovu v konkrétním systému/objektu. Nejvýznamnější je výběr vhodné linie k chovu v systému vystavenému tlaku původců onemocnění, zejména jde o proliferativnímu onemocnění ledvin (PKD) furunkulózu. V našich podmínkách bývá morbidita u vnímavé obsádky většinou 100 % a mortalita ryb v intenzivních chovech spojená s PKD se pohybuje kolem 30 %. Pokud se přidruží sekundární infekce či stres, může být mortalita mnohem vyšší. Bylo potvrzeno, že existují rozdíly v odolnosti lososovitých ryb vůči PKD nejen v rámci jejich druhů, ale i v rámci jednotlivých linií. Výběrem těchto vhodných druhů a linií pro chov v intenzivní akvakultuře, kde není možné zamezit zavlečení původce PKD, lze minimalizovat ekonomické ztráty způsobené tímto onemocněním. Z výsledků hodnocení odolnosti vůči furunkulóze je patrné, že linie pstruhů duhových původem z Itálie reagovala výrazně vyššími titry specifických protilátek a jeví tudíž vyšší odolnost vůči furunkulóze. V porovnání s vnímavostí vůči proliferativnímu onemocnění ledvin (PKD) je to tedy situace odlišná: linie vykazující vyšší odolnost vůči PKD (původ Irsko) je více vnímavá k furunkulóze. Pro chov, ve kterém se vyskytují problémy s oběma onemocněními, je tedy nutné zvážit využití vhodných linií ve vztahu k porovnání ztrát působených původci těchto onemocnění a k přihlédnutí k možnostem jejich tlumení, tj. likvidace mechovek a/nebo správný management nasazování ryb do infikovaného systému u PKD vs. použití antimikrobiálních látek a/nebo vakcinace a imunostimulace u furunkulózy. Pro ekonomické zhodnocení lze tak modelově využít produkční farmu s produkcí 100 tun tržních ryb ročně. Při realizační ceně 130,- Kč za kg tržních ryb se jedná o příjem na úrovni kolem 13 mil. Kč

ročně. Rozdíly ve ztrátách způsobených onemocněním PKD byly u sivenů různého původu na úrovni kolem 5 % (v rozpětí 2-7%), u pstruha duhového pocházejícího ze zahraniční dokonce na úrovni kolem 25 % (v rozpětí 12-38 %) v závislosti na jeho genetickém profilu. Pokud by se chovatel orientoval pouze na produkci pstruha duhového, pak rozdíl ve výši příjmu za prodej tržních ryb by, podle intenzity kumulativních ztrát, dosáhl při výběru vhodné linie Pd zvýšení příjmu o více než 3 mil. Kč ročně.

10. Popis uplatnění technologie

Uplatnění technologie je možné u všech chovatelů lososovitých ryb využívajících zejména systémy chovy s rizikem nákazy uvedených onemocnění. Zdrojem nákazy může být přitékající voda, obsluha systému nebo nakupované ryby. Zároveň je možné využít znalosti z oblasti genetiky a DNA servisu ke genotypizaci vlastních plemenných ryb.

Smlouva o uplatnění ověřené technologie byla uzavřena s firmou BioFish s.r.o. se sídlem Horní Paseka 40, Ledec nad Sázavou.

11. Poděkování

Ověřená technologie Výsledky chovu lososovitých ryb různého genetického původu vznikla za finanční podpory projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QJ1510077 „Zvýšení a zefektivnění produkce lososovitých ryb v ČR s využitím jejich genetické identifikace“. Autoři dále děkují za spolupráci pracovníkům provozních zařízení a pracovníkům specializovaných laboratoří za zpracování dodaných vzorků.

Seznam literatury:

- BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, RAUFASTE N, BONHOMME F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BETTGE, K., WAHLI, T., SEGNER, H., SCHMIDT-POSTHAUS, H., 2009. Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature- related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms* 83: 67–76.
- CLIFTON-HADLEY, R.S., BUCKE, D., RICHARDS, R.H., 1984. Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 7: 363–377.
- CYPRIANO, R.C., HEARTWELL, C.M., 1986. Susceptibility of salmonids to furunculosis: differences between serum and mucus responses against *Aeromonas salmonicida*. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 83–88.
- GRABNER, D. S., EL-MATBOULI, M., 2009. Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Veterinary Parasitology* 165: 200–206.
- GROSS R, GUM B, REITER R, KÜHN R. 2004. Genetic introgression between Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in Bavarian hatchery stocks inferred from nuclear and mitochondrial DNA markers. *Aquaculture International* 12, 19-32.
- CHOW S, HAZAMA K. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7, 1247-1263.
- KENT, M.L., KHATTRA, J., HERVIO, D.M.L., Devlin, R.H. 1998. Ribosomal DNA Sequence Analysis of Isolates of the PKX Myxosporean and Their Relationship to Members of the Genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10: 12-21.
- MAREŠ L., ŘEZNÍČKOVÁ P., BRUMOVSKÁ V. (2016) Elimination of Bryozoans in Intensive Fish Farming. In: MendelNet 2016: Proceedings of International PhD Students Conference. Mendelova univerzita v Brně, Brno, s. 331-336.
- MAREŠ, J., GRMELA, J. (eds.), 2018: Zkušenosti s chovem lososovitých ryb s využitím jejich genetické identifikace. Sborník z workshopu 14. 11. 2018 Brno, 74 s
- MAREŠ, J., LANG, Š., KOPP, R., BRABEC, T., PFAU, R., 2014: Technologie chovu lososovitých ryb v recirkulačním systému dánského typu. Ověřená Technologie, R08/2013, Mendelova univerzita v Brně, 25 s.
- MAREŠ, J., LANG, Š., MAREŠOVÁ, M. G. (eds.), 2016, Zkušenosti s chovem ryb, optimalizací prostředí a veterinární péčí v recirkulačních systémech. Sborník příspěvků, 1. vyd. Brno, Mendelova univerzita v Brně, 15. 11. 2016, 104 s.
- MAREŠ, J., POŠTULKOVÁ, E., KOPP, R., 2018: Ovlivnění kvality masa lososovitých ryb. Ověřená technologie R14/2017, Mendelova Univerzita V Brně, 23 s.

MAREŠ, J., POŠTULKOVÁ, E., VLASÁK, J., Vliv krmné strategie a systému chovu na kvalitu masa lososovitých ryb In Zkušenosti s chovem ryb, optimalizací prostředí a veterinární péčí v recirkulačním systému: Sborník příspěvků. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2016, s. 47—51

MAREŠ, L., ŘEZNÍČKOVÁ, P., MAREŠ, J., 2017, Metodika eliminace mechovek (Bryozoa) v rybochovných zařízeních, Metodika R13/2016, MENDELU, 20 s. ISBN 978-80-7509-483-4

MARSDEN, M.J., FREEMAN, L.C., COX, D., SECOMBES, C.J., 1996. Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. *Aquaculture* 146: 1–16.

MENDEL J, HALAČKA K, MAREŠ J. 2017. Využití polymerázové řetězové reakce, PCR-RFLP techniky a sekvenační analýzy k determinaci homozygotů, vnitrodruhových heterozygotů a mezidruhových hybridů rodu *Salvelinus* v chovných zařízeních. Metodika R15/2017, MENDELU, 24 s. ISBN 978-80-7509-514-5

MENDEL J, JANOVA K, PALÍKOVÁ M. 2018a. Genetically influenced resistance to stress and disease in salmonids in relation to present-day breeding practice - a short review. *Acta Veterinaria Brno*, 89(1), 35-45. DOI: 10.2754/avb201887010035.

MENDEL J, MAREŠ J, PALÍKOVÁ M, HALAČKA K, ABAFFY P, ŠINDELKA R. 2018b. Genetický monitoring aktuálního stavu českých chovů pstruha duhového a sivena v evropském kontextu. Sborník příspěvků z workshopu, Brno 14. 11. 2018, s. 12-18.

MENDEL J, MAREŠ J, PALÍKOVÁ M, HALAČKA K, VETEŠNÍK L, ABAFFY P, ŠINDELKA R. 2018d. Genetika ve službách biodiverzity a akvakultury - tři aktuální případové studie. Sborník příspěvků z konference RybKon 2018, Brno 10. - 11. 10. 2018, s. 64-70.

MENDEL J, MAREŠ J, PALÍKOVÁ M, HALAČKA K, VETEŠNÍK L. 2018c. DNA servis a konkrétní genetické produkty pro chovatele nejen lososovitých ryb. Sborník příspěvků z workshopu, Brno 14. 1. 2018, s. 35-39.

MO, T.A., JØRGENSEN, A., 2017. A survey of the distribution of the PKD-parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Cnidaria: Myxozoa: Malacosporea) in salmonids in Norwegian rivers- additional information gleaned from formerly collected fish. *Journal of Fish Diseases* 40: 621–627.

PALIKOVA, M., PAPEZIKOVA, I., MARKOVA, Z., NAVRATIL, S., MARES, J., MARES, L., VOJTEK, L., HYRSL, P., JELINKOVA, E., SCHMIDT-POSTHAUS, H., 2017. Proliferative kidney disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) under intensive breeding conditions: Pathogenesis and haematological and immune parameters. *Veterinary Parasitology* 238: 5–16.

PLEHN, M., 1911. Die Furunculose der Salmoniden. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originale, Abteilung I* 60: 609–624.

REITER R. H. 2006. Leistungs- und Qualitätseigenschaften jeweils zweier Herkünfte des Seesaiblings und des Bachsaiblings sowie ihrer Kreuzungen [Performance and quality

characteristics of two sources of Arctic charr and brook trout and their crosses]. Dissertation: Technische universität München, p. 193. (In German)

Některé publikace, zejména metodiky, technologie a uvedené sborníky jsou dostupné na www.rybarstvi.eu.

Ověřená technologie: **Výsledky chovu lososovitých ryb různého genetického původu.**

Mareš Jan, Poštulková Eva, Palíková Miroslava, Mendel Jan

Tisk: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně

Vydání: první, 2018

Náklad: 100 ks

Počet stran: 28

ISBN 978-80-7509-625-8