

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
V PRAZE**

Ústav pro životní prostředí

Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana životního prostředí

Bakalářská práce



Použití otolitů ryb při studiu životního prostředí

Application of fish otoliths in environmental studies

Řešitel: Eliška Tůmová

Vedoucí: Ing. Jaroslava Frouzová, Ph.D.

Akademický rok: 2010/2011

Odevzdáno: květen 2011

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala paní Ing. Jaroslavě Frouzové, Ph.D. za vstřícnost a odbornou pomoc při zhotovování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Evě Samšukové za korekturu po dokončení mé práce. V neposlední řadě chci velmi poděkovat svým rodičům za trpělivost a pomoc v průběhu mého studia na vysoké škole.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených pramenů a literatury. Předložená tištěná verze bakalářské práce je totožná s elektronickou verzí, kterou jsem vložila do SIS.

V Praze dne.....

Eliška Tůmová.....

ABSTRAKT

Otolity jsou drobné, bílé minerály tvořené převážně uhličitanem vápenatým. Nacházejí se ve vnitřním uchu ryb a jsou součástí jejich rovnovážného ústrojí a sluchu. Pro biology představují velmi důležitou strukturu, ze které mohou například vyčíst jak je ryba stará, kde a v jakých podmínkách se v průběhu svého života pohybovala i čím se živila. Náplní této práce bude shrnout a uspořádat, informace, které se dají z otolitů vyčíst, dále jaké metody se k tomu používají a jaké jsou jejich možnosti uplatnění při studiu životního prostředí.

Klíčová slova: otolit, stáří ryb, populace ryb, chemické složení otolitů, mikrostruktura otolitů, růst ryb

ABSTRACT

Otoliths are small, white minerals mostly composed of calcium carbonate. They are located in inner ear of fishes and provide balance and hearing. To the biologist, the otoliths are one of the most important structure for understanding the annual age, where and in which conditions the fish was living, and even what was its diet. This paper is focused on summarizing and ordering the use of otoliths, what methods do we use and possibilities of applications in environmental studies.

Key words: otolith, fish age, fish population, chemistry otoliths, microstructure of otoliths, chemistry otoliths, fish growth

Obsah:

1. Úvod.....	6
2. Pozice a morfologie rybích otolitů.....	7
2.1. Různorodost v morfologii rybích otolitů.....	9
3. Chemické složení otolitů.....	10
3.1. Mineralizace a krystalizace otolitů.....	11
3.2. Způsoby transportu jednotlivých prvků do rybích otolitů.....	12
4. Vyjmutí a příprava otolitů pro další výzkum.....	13
4.1. Výběr otolitu a jeho sekce.....	13
4.2. Anatomie sluchového ústrojí.....	14
4.3. Techniky vyjmutí otolitů u ryb.....	14
a) Makroskopické techniky: Otolity větší než 300μm.....	15
b) Mikroskopické techniky: Otolity menší než 300μm.....	17
4.4. Manipulace s otolity po jejich vyjmutí.....	18
5. Možnosti využití rybích otolitů při studiu životního prostředí.....	20
5.1. Mikrostrukturální analýza otolitů.....	20
a) Mikrostrukturální analýza a její využití při studiu živ. prostředí.....	22
♦ Teplota.....	23
♦ Promíchávání vodních hmot.....	23
♦ Vzdálenost larvy od břehu a dostupnost kořisti.....	24
♦ Selektivní mortalita.....	24
♦ Recruitment rybí populace.....	25
5.2. Chemická analýza otolitů.....	26
5.3. Otolit jako značka.....	27
5.4. Určování stáří ryb.....	28
6. Závěr.....	29
7. Použitá literatura a elektronické zdroje.....	31
7.1. Použitá literatura.....	31
7.2. Elektronické zdroje.....	36
8. Přílohy.....	37
8.1. Obrazová příloha.....	37
8.2. Tabulky.....	44

1. Úvod

Cílem této bakalářské práce je s pomocí zahraničních zdrojů literatury a nejnovějších výzkumů, které v této oblasti proběhly, navrhnout, jak by se dala data získaná z otolitů využít pro studium rybích populací v řekách, nádržích a přehradách v České republice. Výzkumy zabývající se otolity jsou nejrozšířenější v Severní Americe a Japonsku. U nás se informace získané z otolitů zatím prakticky vůbec nevyužívají i přesto, že by to byla dobrá metoda pro objasnění řady údajů - například: stáří některých ryb (konkrétně u okouna, kde jsou šupiny u starších ryb velmi těžko čitelné), zjištění ekologické minulosti nebo pochopení jevů, které z tradičních metod nejsme schopni vysvětlit (např. proč jeden rok dojde k rapidnímu úbytku populace).

Otolity jsou drobné minerální útvary a nacházejí ve vnitřním uchu ryby. Slouží jako sluchový orgán, který zároveň zajišťuje rybě rovnováhu. Skládají se z 99 procent z uhličitanu vápenatého, který spolu s otolinem (organická složka otolitů) tvoří nekolagenní matrix. Zbylé jedno procento tvoří stopové prvky, které se v otolitu ukládají během života ryby. Tyto stopové prvky pocházejí z okolního prostředí. Pro biology zabývající se výzkumem otolitů je to nejzajímavější část otolitu, protože se z ní dá vyčíst prakticky celá ekologická minulost ryby, např. v jaké teplotě se ryba zdržovala, přesná doba líhnutí a tření, v jakých vodách se ryba během svého života pohybovala, čím se živila, jak je stará a další zajímavé údaje týkající se jejího života. Jakým způsobem a jak se dají tyto informace z otolitu vyčíst a následně aplikovat ve studiu životního prostředí najdete podrobně popsáno v mé práci.

Otázky na které má práce odpovídá jsou:

Jaká je morfologie a pozice otolitů?

Jaké je jejich chemické složení?

Jakým způsobem se jednotlivé prvky do otolitu ukládají?

Jakým způsobem vypreparujeme otolit?

Jak čteme a rozeznáváme jednotlivé přírůstky?

Jaké využití mají otolity při studiu životního prostředí ve světě?

Jakým způsobem a které znalosti by se daly aplikovat na ryby v České republice?

Pro zodpovězení těchto otázek jsem používala zejména primární prameny v podobě anglicky psaných článků z různých časopisů zabývajících se výzkumem ryb a jejich ekologií. V několika případech jsem použila i sekundární zdroje, zejména pro získání obecnějších

informací o otolitech a hlavně o jejich výzkumu, abych získala přehled, kde všude a jak se dají využít.

Otolity jsou struktury, které se studují přibližně od roku 1930. Díky tomu existují tisíce vědeckých článků zabývajících se jejich problematikou.

Otolity se v souvislosti se životním prostředím začaly zkoumat až před necelými dvaceti lety. Jako podklady k této práci jsem se snažila vyhledat ty nejnovější články, abych poskytla aktuální přehled o celkové problematice. Problém, na který jsem narazila bylo nedostatek informací o výzkumu u sladkovodních ryb. Proto jsem pro prezentaci použila ryby žijící v mořích a oceánech nebo ryby migrující ze slané vody do sladké.

2. Pozice a morfologie rybích otolitů

Kostnaté ryby (Telostei) mají jako ostatní obratlovci oboustranně (bilaterálně) souměrné vnitřní uši kromě druhů se zploštělým tělem (Nolf 1985). Nachází se uvnitř lebky (cranium) na každé straně hlavy, přibližně ve stejné výšce jako zadní mozek (rhombencephalon) a jsou zásobovány VIII. hlavovým nervem.

Vnitřní ucho je komplexní struktura uzavřených membránových chodbiček a váčků, které se nazývají labyrint. Uvnitř v dorzální části se nachází tři polokruhovitě kanálky. Každý kanálek je ve spodní části lehce vyvýšený. Tato vyvýšenina se nazývá ampulla (kulovitý váček), z které příčně vyrůstají smyslové brvy. Příčná rýha odkud tyto brvy vyrůstají se nazývá crista ampullaris (Popper et al. 2003). Ve spodní části kanálků jsou tři orgány ve tvaru polokruhovitých váčků, které se nazývají sacculus, utriculus a lagena. V nich se nacházejí tři okrsky obrveného smyslového epitelu (tzv. maculi).

Utriculus je umístěn ve spodní části kanálků. Jeho smyslový epitel, tzv. macula utriculi, se nachází v jeho dolní části. Utriculus má u všech druhů ryb velmi podobný tvar a ultrastrukturu smyslového epitelu, která se velmi podobá utriculu ostatních obratlovců.

Pod utriculem se nachází saccula se smyslovým epitelem nazývaným macula sacculi, který se vytvořil ve středové části. Saccula, co se týče stavby, je nejrozmanitější ze všech třech polokruhovitých váčků.

Lagena je vertikálně zploštělý váček u zadní části sacully, která má svůj smyslový okrsek rovněž ve středové části. U většiny kostnatých ryb (Telostei) je lagena i její otolit o mnoho menší než saccula a utriculus.

Tyto tři polokruhovitě váčky (utricleus, saccula a lagena) jsou vyplněny tekutinou (endolymfou) a tvrdými útvary tvořenými uhličitanem vápenatým (CaCO_3), které nazýváme otolity (otoconia). Otolity dráždí vlivem gravitace povrch obrveného epitelu a díky tomu je organismus přesně informován o vlastní poloze v prostoru. Všechny skupiny kostnatých ryb v průběhu života využívají nehybnost otolitů k jejich zvětšování nepřetržitým obalováním pomocí minerálů usazených ve vodě (Ladich and Popper 2004).

U paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) vyplňují otolity téměř celou dutinu sacculu. Každý rod, ale i druh, má charakteristický tvar otolitů. Tím se nabízí možnost jejich využití při určování v taxonomickém systému ryb (Roček 2002, Popper et al. 2003). Vzhledem k tomu, že ryby postrádají hlemýžďovitou část ušního labyrintu, slouží otolity i jako sluchový orgán. Všechny tři páry otolitů v každém váčku se liší funkcí, tvarem, velikostí a mikrostrukturou (Lowenstein 1971 podle Secor et al. 1991). Dobrá znalost anatomie vnitřního ucha (resp. sacculu) ryb je podmínkou pro účinné vyjmutí otolitu, jeho definování, výběr potřebných broušících pomůcek na jeho další analýzu pod mikroskopem a pro přesnou dokumentační metodiku.

Přesná terminologie stavby otolitů byla vytvořena v roce 1995 jako výsledek prvního mezinárodního sympózia, které se zabývalo jejich výzkumem. Sympóziium proběhlo v lednu v roce 1993 v Jižní Karolíně (USA). Nyní pro bližší charakteristiku otolitů a pochopení jejich stavby vysvětlím termíny a pojmy, s kterými budu v této práci pracovat.

Antirostrum - přední a hřbetní část sagitty, zpravidla kratší než rostrum (Obr. č. 1).

Asteriscus (pl. asterisci) - jeden ze tří párových otolitů, který se nachází ve smyslovém okrsku kostnatých ryb. Vyplňuje lagenu ve spodní části. Je téměř kruhovitý, laterálně zploštělý. U nadřádu Ostariophysi a čeledi Rypákovitých (Mormyridae) je výrazně větší než sagitta.

Lapillus (pl. lapilli) - jeden ze tří párových otolitů, který se nachází ve smyslovém okrsku kostnatých ryb. U většiny ryb má tvar zploštělé koule a je menší než sagitta. Nachází se v dorzální části v utriculu.

Opaque zone (neprůsvitný pruh) - tmavý pruh na sagittě. Pásmo, které zamezuje průchodu světla a vedle průsvitného pásma (translucent zone) se jeví jako tmavé (Obr. č. 2).

Rostrum - přední a břišní část sagitty, zpravidla delší než antirostrum (Obr. č. 1).

Sagitta (pl. sagittae) - jeden ze tří párových otolitů, který se nachází ve smyslovém okrsku sacculu kostnatých ryb. Obvykle je laterálně zploštěn a má ve většině případů eliptický tvar, který se ale mění podle druhu. Sagitta je, až na výjimky, největší, nejčitelnější a nejvíce používaný otolit při výzkumech (Obr. č. 1 a 2).

Sulcus acusticus (běžně se zkracuje na sulcus)- podélná rýha, která se nachází ve středové části povrchu sagitty. Uvnitř se nachází zesílená část otolitické membrány. V pracích týkajících se otolitů je velmi často uváděna díky velké srozumitelnosti přírůstků, které se nacházejí poblíž této rýhy (Obr. č. 1 a 2).

Translucent zone (průsvitný pruh) - pruh na sagittě, který dovoluje průchod většího množství světla než neprůsvitný pruh (opaque zone; Obr.č. 2; Secor 1995).

Tři páry otolitů jsou nejčastěji nazývány lapillus (pl. lapilli), sagitta (pl. sagittae) a asteriscus (pl. asterisci). V průběhu doby pro ně bylo použito mnoho dalších synonym. Jejich fotografie, popis a některá synonyma, která se mohou vyskytovat v další literatuře, jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

2.1. Různorodost v morfologii rybích otolitů

Různorodost tvarů a velikosti otolitů mezi druhy je úchvatná. Bez předchozí zkušenosti je velmi těžké odhadnout tvar, velikost, ale i umístění otolitu.

Nejvíce zřejmá odlišnost otolitů je u nadřádu Ostariophysi, kam patří pět řádů (Maloústí - Goniorhynchiformes, Máloostní - Cypriniformes, Trnobříší - Characiformes a Sumci - Gymnotiformes). Zde jsou asterisci větší než sagittae. Asterisci těchto skupin jsou obvykle kulaté nebo oválné a sagittae jsou srpovitého nebo jehlovitého tvaru. Velikost a tvar asterisci u těchto druhů umožňuje použití tohoto otolitu k mikrostrukturální analýze lépe než sagittae. Stejně zvětšenou lagenu mají i ryby z čeledi Rypákovitých (Mormyridae), což je skupina taxonomicky velmi vzdálená od Ostariophysi. Zvětšená lagena u dvou systémově vzdálených skupin se s největší pravděpodobností vyvinula nezávisle na sobě. Ucho Rypákovitých dokáže díky tomuto jevu rozeznat velmi široký vlnový rozsah zvuku.

Sagittae jsou u ostatních čeledí největší otolity. Jejich struktura a složení jsou dobře čitelné. Díky tomu je sagitta nejčastěji používaný otolit pro mikrostrukturální analýzu. Největší sagittae se vyskytují u ryb, které mají velmi dobře vyvinutý sluch, a pro které je velmi důležitá vzájemná komunikace. Jsou to například ryby z čeledě Treskovití (Gadidae), Žabohlavcovití (Batrachoididae) a Smuhovití (Sciaenidae). Další skupinou s obzvláště velkými sagittae jsou ryby z hlubokých moří z čeledi Hlavounovití (Macrouridae) a Hrujovití (Ophidiidae). U nich se předpokládá, že je sluch také důležitý.

Další velice zajímavou odchylku v morfologii otolitů nacházíme v utricule (lapilli), která je u většiny skupin konzervativní. Jsou jí lapilli křížovce kočičího (*Ariopsis felis*) z čeledi Křížovcovití (Ariidae). Otolit je velmi mohutný ve srovnání s ostatními druhy z této

čeledi, avšak utriculární smyslový epitel nepokrývá celou spodní hemisféru, jak je tomu u ostatních obratlovců, ale nachází se pouze ve střední linii. Tato stavba je spojována s neobyčejně citlivým sluchem, zejména, v nízkých frekvenčních hodnotách s úzkým vlnovým rozsahem okolo 1,5 kHz, přičemž ostatní ryby jsou schopné rozlišit 3 kHz (Ladich and Popper 2004). Sledí a sardele (*Clupeomorpha*) mají utriculu rozdělenou na tři oddělené smyslové okrsky (*maculi*). Horní je plynem vyplněná komora, která rozšiřuje vzduchový měchýř a výrazně zjednodušuje pohyb ve vodě. Několik druhů rodu placka (*Alosa*) je díky jedinečné stavbě utriculu schopna rozlišit ultrazvukové signály okolo 180 kHz.

Některé odlišnosti ve velikosti otolitů mohou záviset na vzrůstu ryby. Zdaleka zde neplatí pravidlo, že čím je ryba větší, tím je větší i otolit. Naopak u některých obrovských ryb mohou být otolity daleko menší než u velmi malých ryb. Je tomu tak například u tuňáka (*Thunnus*) z čeledi Makrelovitých (*Scombridae*) nebo u mečouna (*Xiphias*) z čeledi Ostnoploutví (*Perciformes*). Tyto ryby mají vzhledem ke své velikosti poměrně malé otolity. Existuje teorie, která praví, že velikost otolitů se výrazně projevuje na rovnováze a pohybu ryby ve vodě. A právě tuňáci a mečouni jsou velmi rychlé a hbité ryby schopné prudkých otoček a okamžitých změn směru, při kterém využívají malé otolity (Popper et al. 2005). Naopak pomalejší nebo bentické ryby, např.: Kanícoví (*Serranidae*), Smuhoví (*Sciaenidae*), Treskoví (*Gadidae*) a Okounoví (*Centrarchidae*) mají otolity výrazně větší.

Otolity se mění při růstu ryby, zejména v průběhu embrionálního a larválního stádia. *Sagittae* a *lapilli* jsou v těchto stádiích dobře rozeznatelné, protože mají už od začátku diskovitý tvar. *Asteriscus* se obvykle utváří později a má původně také diskovitý tvar. Protože tvar a velikost při těchto stádiích vývinu je téměř stejná je důležité se zaměřit na vzájemnou polohu otolitů v hlavě larvy a embrya (Secor et al. 1992). Tvar a velikost otolitů můžeme také spojovat s geografickým rozšířením, hloubkou oceánu a kvalitou prostředí (Secor et al. 1991).

3. Chemické složení otolitů u ryb

Otolity jsou metabolicky inertní tělesa. To znamená, že jakýkoli prvek nebo sloučenina, která se v průběhu života uloží do otolitu, v něm také zůstane, zatímco otolit stále roste a díky tomu je tímto způsobem zaznamenáván celý život ryby od vylíhnutí se až po její smrt. Jedná se o jakousi „černou schránku“ života ryby. Ve zkratce tak otolit může obsahovat kompletní záznam o tom, jaké bylo chemické složení okolní vody, ve které se ryba pohybovala, a odkud a kam migrovala. Díky této schopnosti otolitů se může být ryba

přirozeně nebo chemicky označena a použita pro další výzkum (Campana 1999). U volně žijících ryb je vhodné chemické složení otolitů porovnat se stejným druhem, který žil v experimentálních podmínkách. Tzn. v okolí, u kterého známe přesné chemické složení (Radtke and Shafer 1992).

Složení otolitů je relativně chudé ve srovnání s ostatními biologickými a mineralogickými strukturami. Největší zastoupení má uhličitan vápenatý (CaCO_3), který tvoří spolu s organickým materiálem (otolin) nekolagenní organický matrix (základní hmotu). Celkem bylo v otolitech zaznamenáno 31 prvků. Nebyly mezi ně počítány radioaktivní prvky jako thorium a radium. V základním složení dominují hlavně vápník (Ca), kyslík (O) a uhlík (C), ostatní obsažené prvky (Na), stroncium (Sr), draslík (K), síra (S), dusík (N), chlór (Cl), a fosfor (P) patří mezi minoritní prvky (>100 ppm) a spolu se stopovými prvky (<100 ppm) tvoří méně než 1% celkové hmoty otolitů. Jednotlivé zastoupení prvků v dosud známých výzkumech je zobrazeno v Tabulce č. 2. Tyto prvky tvoří jak organické sloučeniny, jako jsou některé proteiny, tak anorganické sloučeniny (Campana 1999). Uhličitan vápenatý tvoří okolo 96 - 97 % spolu s anorganickými nečistotami, které tvoří méně než 1 % a organické sloučeniny jsou zastoupeny ve 3 - 4 % z celkové hmoty otolitu (Edmonds et al. 1992).

3.1 Mineralizace a krystalizace otolitů

Mechanismus růstu a mineralizace otolitů se liší od kostí obratlovců, ulit a škeblí měkkýšů a schránek korálů v tom, že epitel otolitu není v přímém kontaktu s místem kalcifikace. Díky tomu je kalcifikace ve velké míře závislá na složení endolymfatické tekutiny, která obklopuje otolit (Campana 1999 podle Payan et al. 1997). Mineralizaci otolitů regulují neurony a ovlivňují ji okolní podmínky (gravitace). Je to až dosud jediný známý biomineralizační proces, který je regulován v závislosti na okolním prostředí (Anken 2006).

Další faktor, který ovlivňuje kalcifikaci, je pH endolymfy, které je určeno koncentrací uhličitanového iontu (jeden z iontových produktů oxidu uhličitého v roztoku). Snižování alkality v endolymfě je regulováno sekrecí protonů přes sacculární epitel. Tyto ionty snižují rychlost kalcifikace (Campana 1999 podle Payan et al. 1997).

Tento anorganický jev však zcela nevysvětluje okolnosti tvorby všech přírůstků, které jsou v otolitu. Bohužel ještě nebyl uspokojivě vysvětlen celý proces kalcifikace, ale zásadní roli v něm hrají proteiny (glykoprotein a proteiny schopné vázat vápník). Proteiny tvoří 1 - 8 % hmoty otolitů a jsou v otolitu velmi nerovnoměrně rozmístěné. Polovina z nich je

nerozpustná a vytváří kostru pro následující kalcifikaci. Další proteiny jsou ve vodě rozpustné a regulují rychlost kalcifikace, působí jako inhibitor (Borelli et al. 2001).

Uhličitan vápenatý může krystalizovat ve třech podobách: kalcit, aragonit a vaterit. Aragonit a vaterit jsou za normálních podmínek velmi nestabilní. I přesto je sagitta a lapillus tvořená z polykrystalického ortorombického aragonitu a lapillus je utvořen z vateritu. To, že jsou otolity tvořeny z aragonitu a vateritu, vysvětluje malé množství dvojmocných iontů stroncia (Sr) a hořčíku (Mg) a skupina zatím neznámých proteinů, která zajišťuje, aby krystal, který se vytvoří, měl danou velikost, strukturu a formu (Ren et al. 2010).

3.2 Způsoby transportu jednotlivých prvků do rybích otolitů

Transport jakéhokoli prvku nebo iontu z okolního prostředí do otolitu má několik fází a je charakterizován velkým množstvím více nebo méně důležitých bariér. Překážky pro prvky a ionty jsou nezbytným předpokladem pro organismus s vysokým stupněm osmoregulace, jakým ryba je. Avšak transport jednotlivých prvků a iontů do otolitů je ještě více regulován než v jiných jím podobných tkáních. Například kalcifikované tkáně, jako jsou kosti, obsahují daleko vyšší koncentraci většiny prvků než otolity, zatímco nekalcifikované struktury, například oční čočky, jsou charakterizovány odlišnou škálou prvků. Vysoký stupeň regulace je nejvíce známý u primitivních zvířat (korálů), které mají tendenci tvořit své schránky se stejným složením jako má okolní voda. Překvapivě i otolity mají stejnou tendenci narozdíl od ostatních struktur komplexních organismů, jako je ryba.

Základní transportní dráha většiny anorganických prvků do otolitů probíhá z vody přes krevní plazmu. Do těla ryby se voda dostane přes žábry nebo střevo. Z krevní plazmy prvky putují dál do endolymfy a nakonec do krystalizujícího se otolitu. Velmi malé množství anorganických prvků pochází z jídla (např. stroncium (Sr), (Campana 1999 podle Hoff and Freiman 1995). Jak můžeme vidět na Obrázku č. 4 regulace iontů a prvků může nastat na jakémkoli rozhraní: voda-žábry, krev-endolymfa a endolymfa-otolit. Poměr vápníku je v otolitu o dost nižší než v krevní plasmě nebo okolní vodě. Můžeme však zaznamenat veliký rozdíl v míře, v jaké jsou prvky regulovány i v místě, kde k němu dochází (Campana 1999). Bezesporu největší ztrátu zaznamenáváme na hranici voda-žábry, popř. voda-střevo, kde osmóza reguluje pohyb iontů a prvků směrem z okolní vody do rybího organismu tak, že se do krevní plasmy dostane už jenom třetina vápníku a ostatních hlavních prvků.

4. Vyjmutí a příprava otolitů pro další výzkum

4.1. Výběr otolitu a jeho sekce

První rozhodnutí, které se musí při výzkumu učinit, je výběr vhodného otolitu. Nejlepší je zvolit otolit, který má nejkvalitnější a nejpravidelnější mikrostrukturální přírůstky. Ve většině případů vybíráme ten největší otolit, který se snadno odstraňuje z hlavy ryby a manipulace s ním je nejlehčí. Sagittae obsahují ve většině případů nejširší a nejlépe čitelné přírůstky. Z těchto důvodů se vědci pro sagittae rozhodli v šedesáti procentech studií (statistiky zahrnují 221 rozhodnutí vytvořených podle použití otolitů u individuálních druhů). Někdy může být těžší vyčistit a rozlišit denní přírůstky z rychle rostoucího otolitu. V těchto případech se používají lapilli. Bohužel zde hrozí, že přírůstky budou tak úzké, že je nebude možno rozluštit. Z těchto důvodů je vhodné a doporučuje se pro další analýzu použití obou dvou otolitů současně.

Při studiích nadřádu Ostariophysi se jako nejjasnější otolity používají lapilli a někdy asteriscus, ten ale nikdy ne samotný. Sagittae se jako hlavní otolit používá pro nadřád Ostariophysi u druhů z čeledi: Sumečkovití (Ictaluridae), Sumíčkovití (Bagridae) a Chanidae.

Výběr sekce (řezu) záleží na směru růstu narůstajících prstenců. Například u většiny okounovitých (Percidae) vybíhají prstence od sagittální plochy, tudíž ve všech okrajových částech sagittální oblasti nenajdeme žádné přírůstky. Příčný řez obsahuje užší přírůstky než řez přední plochou. Při použití sagittae jako nejběžnějšího otolitu se navrhuje optimální řez podél předozadní růstové osy. Je důležité mít k dispozici více řezů různých ploch, abychom eliminovali řezy, ve kterých jsou přírůstky nejasné nebo řezy, ve kterých dochází ke změnám v růstových osách, popřípadě řezy, ve kterých se nachází druhotné růstové centrum (secondary growth center) - nové růstové centrum vytvořené mimo hlavní otolit, které tvoří novou plochu, ze které vyrůstají další přírůstky (Secor et al. 1995). Některé otolity nemají jednu vrstvu, která obsahuje všechny přírůstky. V tomto případě se k analýze používá jen jedna část otolitu (např. rostrum) nebo jiné dělicí techniky (více řezů za sebou nebo jeden šikmý řez) a doporučuje se použití jiných, čitelnějších otolitů (Secor et al. 1992 podle Wild and Foreman 1980).

4.2 Anatomie sluchového ústrojí

Dospělí jedinci mají pět ušních kostí (sphenotic, pterotic, prootic, epiotic a opisthotic), které tvoří sluchový aparát. Tyto kosti splývají okolo sagittae a asteriscu (Greerinckx et al. 2007, podle Harrington 1955). U velkého počtu druhů ryb je sagitta zanořená ve spodní části dutiny lebeční tak, že je její zadní část naprosto uzavřená okolními kostmi. Naopak u jiných druhů, zejména lososovitých (Salmonidae), okounovitých (Percidae) a kostlínovitých (Lepisosteidae), není tolik stísněná v lebeční komoře. U většiny druhů kostnatých ryb (Telostei) je přední část sagitty stočená laterálně (lehce zvlněná) v lebeční dutině.

Lapillus se nachází v blízkosti splnutí tří semicirkulárních kanálků a je jen zřídka zcela uzavřen v kosti. U juvenilního morčáka pruhovaného (*Morone saxatilis*) se lapillus nachází nad jednou z ušních kostí (pterotic).

Asteriscus je většinou v těsné blízkosti sagitty. Ryby z nadřádu Ostariophysi mají asteriscus ve své vlastní dutině umístěný v zadní až lehce dorzální části sagitty

4.3. Techniky vyjmutí otolitů u ryb

Metoda, která se použije na odstranění otolitů, závisí na morfologii sluchového aparátu, velikosti ryby, na konzervační metodě vzorku a na individuálních výhodách a preferencích daného vzorku. V této sekci se budu stručně zabývat nejběžnějšími metodami, které se používají při odstranění otolitů z hlavy ryb. Následující techniky budou prezentovány podle velikosti otolitu, která bude definována jeho délkou. U sagittae se otolit měří od rostra k postrostru (Obr. č. 1). Otolity, které měří méně než 300 μm , je těžké vidět a obtížně se s nimi manipuluje. Tento způsob měření je smluvený a pomáhá nám určit rozdíl mezi mikroskopickými a makroskopickými technikami. Jak už je výše zmíněno, velikost otolitů není závislá na velikosti ryby. 300 μm dlouho sagittu může mít jak morčák pruhovaný (*Morone saxatilis*) v larválním stádiu, tak 1 kg těžký mečoun obecný (*Xiphias gladius*). Proto je lepší používat techniky, které jsou založené na velikosti otolitu než ty, které jsou založené na velikosti ryby.

a) Makroskopické techniky: Otolity větší než 300 μm

U ryb jejichž otolity jsou větší než 300 μm se běžně používají následující čtyři techniky, které jsou závislé na velikosti hlavy ryby a počtu kostí v hlavě. Nástrojů na řezání je celá řada od drobných žilek a nožů až po třeba pilku na maso.

Open-the-hatch-method: Tato metoda se používá u postranně zploštělých ryb jako jsou třeba ryby z čeledi platýsovitých (Pleuronectidae), u ryb s relativně velkými otolity a u ryb jejichž sagitta je umístěna v blízkosti středu sagittální plochy. První řez této metody je příčný. Proveďte se v týlové části nebo u zadního skřelového okraje od vrchní (hřbetní) ke spodní (břišní) části. Dále se pokračuje v řezu na břišní části tak, aby tento řez končil paralelně s vrchním okrajem očních důlků. Následuje řez v přední části lebky, který vedeme kolem horního okraje očních důlků a pokračujeme k počátku výchozího řezu. Tyto řezy odhalí mozek. Po provedení řezů se opatrně odstraní mozek. U ryb s menšími nebo méně viditelnými otolity se použije lupa. První, na co je důležité se po odstranění mozku zaměřit jsou semicirkulární kanálky, které se nacházejí podél postranních okrajů lebeční dutiny (crania). První otolit, který se pinzetou odstraní, je lapillus. Spolu s ním odstraníme i část utriculárního váčku a semicirkulárních kanálků. Jako druhý otolit se vyjme sagitta. U ryb s částečně nebo úplně zapouzdřenou sagittou je důležitá velká opatrnost při odstraňování, abychom nepřišli o nějaké důležité části (např. rostrum). Asteriscus je u ryb, kde se provádí tato metoda, v těsné blízkosti sagitty. Opatrně se odstraní sacculus (dutina, ve které je sagitta) tak, aby asteriscus i lagena zůstaly nepoškozené a připojené k sacculu.

Guillotine method: Používá se při odstranění sagittae u velkých ryb (juvenilních - sagittae větší než 3 mm a dospělých - sagittae větší než 100 mm) a u ryb z čeledi platýsovitých (Pleuronectidae). Tato metoda představuje jeden příčný řez, který se provede od horní části hlavy přes preopercle (kost tvaru bumerangu, která se nachází v zadní dolní části tváře). Po provedení řezu se otočí hlava směrem od těla. Vidíme zde postrostrum sagitty spolu s pouzdrem motýlkového tvaru, ve kterém je uložena sagitta. Pokud toto pouzdro a postrostrum nevidíme, musí se udělat ještě jeden dodatečný řez, který je nasměrován dopředu k výchozímu řezu. Když vidíme otolit, uchopíme ho a jemnými pohyby směrem dopředu a dozadu s ním posouváme, dokud se neuvolní. Tato metoda vyžaduje určité zkušenosti, protože řez se neprovádí vždy přesně přes preoperculum a je zde velké riziko poškození sagitty. Na druhou stranu je tato metoda velmi rychlá a vhodná při větších velikostech sagittae. U nadřádu Ostariophysi se tato metoda používá na vyjmutí asteriscu.

Metoda *Right between the eyes* se používá při vyjmutí sagittae z hlubinných ryb, při odstranění asteriscu u ryb z nadřádu Ostariophysi, při úplně prvním odstranění jakéhokoli otolitu a při odstranění lapillu. U této metody je řez veden od ústní části středem hlavy až k operuculu. Často se odděluje hlava od těla před nebo po provedení prvního řezu pro větší pohodlnost práce. Po opatrném odstranění obou půlek mozku se po stranách odkryje celé sluchové ústrojí, přičemž kosti neurocrania obklopují z větší části semicirkulární kanálky. Nejdříve se odstraní utriculární váček a lapillus. Kvůli těsné poloze sagittae u středu hlavy je důležité přesně rozpůlit lebku na dvě části, aby se tyto otolity neporušily. U větších ryb se doporučuje nejdříve oddělit hlavu od těla a odstranit spodní čelist. Pak umístit hlavu přímo a bezpečně na rovnou plochu, kde se provede půlící řez. Pro ryby z nadřádu Ostariophysi je tato metoda vhodná, jsou-li asterisci lehce na straně od sagittální plochy. Tato metoda je vhodná také u druhů, u kterých nemáme předešlé zkušenosti s analýzou otolitů a dovoluje nám pohled na anatomickou polohu všech otolitů a celého středního ucha. Bohužel, je velmi obtížné odstranit touto metodou otolity u ryb z čeledi platýsovití (Pleuronectidae) a u ryb, jejichž sagittae jsou velmi blízko středové linii. Naopak u velkých a hlubinných ryb, které mají širokou hlavu jako čtverzubci (Tetradontidae), ježikoví (Diodontidae) a d'asovití (Lophiidae) je tato metoda odstraňování otolitů nejvhodnější.

Poslední metoda, která se používá, se nazývá *Up through the gills method*. Tento způsob je určen pro juvenilní a mladé dospělé ryby, které dosahují délky 15 - 200 mm a pro bočně zploštělé ryby (například ryby z čeledi platýsovití - Pleuronectidae). Provádí se řezem nebo odtrhnutím hlavy v místě žáber od zbytku těla. U menších ryb (délka těla < 100 mm) se po tomto zásahu objeví část jedné z lebečních kostí (prootic). U větších ryb je nutné odříznout žaberní oblouky a odloupnout epidermální, spojovací a svalovou tkáň z neurocrania před tím než je vidět část prooticu. Kleštěmi se lehce naštipne nebo roztrhne lebeční kost, pod kterou se nachází sagitta. Sagitta se pinzetou uchopí a jemným pohybem směrem dopředu a dozadu se oddělí od ostatních částí vnitřního ucha. Zvláštní opatrnost se klade na to, aby se sagitta nezatlačila příliš do mozku, protože pak je velmi těžké jí získat nepoškozenou. Jako Guillotine metod je i tato metoda vhodná pro získávání sagittae u všech ryb mimo nadřád Ostariophysi. Ostatní způsoby se používají na získání dalších otolitů (lapilli, asterisci). S určitou praxí může být způsob *up through the gills* velmi rychlý, obzvláště pokud chceme získat otolity z juvenilních a mladých dospělých ryb.

Ani jeden z těchto způsobů není přesně daný. Může se použít jakákoli jejich kombinace. Například pokud začneme pitvat prvním způsobem a po odstranění mozku bude těžké lokalizovat otolity, můžeme pokračovat metodou *between the eyes*.

Existuje ještě jeden způsob pitvy, který se provádí v laboratorním prostředí. Nazývá se *Dry*, "*crunch and crumble*" a používá se na odstranění všech otolitů u malých ryb. Nejprve se ryba zahřeje v troubě na 40 - 60 °C, dokud se úplně nevysuší. Doba vysoušení okolo jednoho až tří dnů. Záleží na velikosti ryby. Vysušená ryba se opatrně rozdrťí nebo rozláme. Po rozdrčení se oddělí kalcifikované otolity od zbytku ryby. Malé otolity (< 1 mm) je těžší oddělit pouhým okem. Pohotovému objevení nám zajistí mikroskop s polarizovaným světlem. Tento způsob pitvy může být velmi výhodný, zvláště u psaní protokolů, které vyžadují přesnou hmotnost sušiny. Bohužel ho nemůžeme uplatnit u druhů, které mají křehké otolity nebo otolity, které se hůře hledají.

b) Mikroskopické techniky: Otolity menší než 300 μm

Následující tři způsoby jsou vhodné při vyjmutí otolitů, které dosahují menších rozměrů než 300 μm. Manipulace s nimi je obtížnější proto, že je nemůžeme pozorovat pouhým okem, ale pouze za pomoci mikroskopu. Kvůli tomu se po vyjmutí otolitu zároveň doporučuje i jeho vyčištění a zakonzervování.

První mikroskopická technika se nazývá: *Teasing method* a je vhodná u větších otolitů larev (délka otolitů 50 - 300 μm). Laboratorní sklíčko zakápneme vodou, ethanolem (> 70 %), glycerinem nebo jiným čisticím prostředkem a umístíme na něj malou rybu. Pod mikroskopem najdeme pomocí křížového polarizovaného světla otolity. Pomocí pitvajících jehly se odstraní. U některých případech je vhodné před odstraněním otolitů oddělit hlavu od zbytku těla larvy. Zacházení s otolity během pitvy vyžaduje pevné ruce, vhodné nástroje, zkušenosti a trpělivost. Po odstranění otolitů z hlavy se lehce seškrábnou zbytky tkání tak, aby byl otolit co nejčistší. Otolit se na sklíčku označí nebo se vytvoří kruh kolem jeho okrajů pro usnadnění další manipulace s ním.

Další způsob, kterým můžeme získat otolit, se jmenuje *Bleaching method*. Používá se u velmi malých otolitů, které jsou 100 μm dlouhé. Zajímavé je, že některé velké ryby, například mečoun (*Xiphias*), tuňák (*Thunnus*) nebo ježík (*Diodon*) mají takto malé otolity. Tato metoda je bezpečná pro pozorování otolitů všech malých ryb. Pod mikroskop se umístí malá ryba, která dorůstá délky maximálně 20 mm, a ponoří se do několika kapek bělidla s žíravými účinky (chlornan sodný). Během tří minut se žíravina dostane k otolitům, které díky jejich struktuře nepoškodí. Před tím, než žíravina uschne, se otolity pomalu opláchnou destilovanou vodou. Po omytí se vysuší nebo se voda a zbytky žíraviny odsají sacím papírem. Otolity větších ryb (10 - 100 mm) také mohou být odstraněny pomocí této metody. S tím

rozdílem, že se buď celé ryby, nebo jejich části umístí do nádoby s žíravinou. Po rozleptání tkáně, které trvá pět minut až několik hodin, najdeme otolity na dně nádobky. Pokud jsou otolity větší, nemusíme sledovat jejich přesnou polohu během působení žíraviny. Tato metoda se ukázala jako bezpečná pro pozorování všech tří otolitů bez jejich poškození. Není vyzkoušena na larválních stádiích ryb.

Poslední způsob se nazývá *Embedding method* a používá se u otolitů, které jsou menší než 100 μm . Takto malé otolity mají většinou embrya ryb. Je to metoda, která se podobá metodě předchozí (*Bleaching method*) a je vhodná pro pozorování otolitů larev. Vzorek larvy se úplně zbaví vody a ponoří se do pár kapek se 100% ethanolem. Potom se do vzorku přikapává v předem daných poměrech konzervant (poměry 100% ethanolu : konzervantu - 1:1, 1:3, 1:9, 0:1). Je důležité, aby se konzervant spojil s ethanolem bez přidání jakéhokoli katalyzátoru. Po zakonzervování larvy se použije konzervant s nízkou viskozitou a vyleští se s ním plochy otolitů, které se obloží plastem tak, aby byly vidět. Tento způsob vyjmutí otolitů vyžaduje čas a zkušenosti, má však mnoho výhod. Díky zakonzervování larvy je možné otolity dále analyzovat a přesně určit všechny tři typy otolitů a jejich anatomickou pozici v původním stavu.

4.4. Manipulace s otolity po jejich vyjmutí

Pro další práci s otolity je důležité správné uchovávání, zacházení a vyčištění. Na povrchu otolitů se po vyjmutí z hlavy ryby vyskytují vláknité tkáně, které jsou pozůstatkem kanálků a semicirkulárních váčků vnitřního ucha. Kvůli lepším výsledkům, snadnějšímu pozorování a lepšímu zakonzervování je důležité se jich zbavit. Pro tyto účely používáme různé čisticí oleje, které mohou zlepšit rozlišení mikrostruktury otolitů, mechanické odstranění, které se musí provádět s velkou obezřetností, a nebo použijeme nějaké žíraviny, například chlornanu sodného, který se používá i při vyjímání malých otolitů.

Po vyjmutí se s otolity zachází podle jejich velikosti. S otolity většími než 300 μm je manipulace výrazně snadnější. Používá se pouze pinzeta. Otolity se ukládají do zvláštních misek, ve kterých se mohou zrovna vyčistit a zakonzervovat. Nedoporučuje se je ukládat v papírových obálkách, protože hrozí jejich poškození. S menšími otolity než 300 μm se zachází se speciální péčí. Buď pinzetou, ale s velkou opatrností, aby nedošlo k jejich rozdrčení a nebo několika způsoby, které vyžadují trpělivost a zručnost. Jeden ze způsobů je použití pipety, pomocí které otolit s malým množstvím tekutiny, ve které je otolit namočený, přeneseme pod mikroskop. Další způsob je za pomoci jehly, kdy otolit přesuneme na okraj misky ve které se

nachází, odsajeme všechnu tekutinu okolo a lehce prstem přimáčkeme tak, že se otolit dostane přesně mezi epidermální rýhy čisté ruky a pomocí jehly určené k pitvání ho přesuneme na požadované místo. Poslední možnost se využívá, když je otolit suchý. Jehla se namočí a pomocí kapky k ní otolit přilne a může se libovolně přemístit.

Velkou většinu otolitů musíme před jejich další mikrostrukturální analýzou připravit. Menší otolity stačí pouze vyčistit a připevnit k podložce. Na připevnění se použijí látky, které zamezují klouzání otolitů po podložce a mohou se použít i na větší otolity k jejich lepšímu obroušování. Ve většině případů používáme konzervační média nebo různá specializovaná lepidla. Velké otolity (50 - 300 μ m), které mají členitou strukturu, nemůžeme analyzovat bez leštění, broušení a pilování. Cílem při broušení otolitů je příprava sekce tak, aby byla zřetelná jedna plocha, která obsahuje všechny přírůstky (jádro) potřebné pro celkovou analýzu mikrostruktury. Někdy může být dostatečné pouze odstranění vápenitých výrůstků a zbytků, které se na otolitu vytvořily. V tomto případě brousíme pouze jednou a nebo tzv. dvojité broušení, kdy vznikne velmi tenká deska (široká okolo 50 μ m). Tato technika vyžaduje po obroušení jedné části otočení otolitu a obroušení z druhé strany tak, aby vznikla požadovaná šířka desky. Před tím, než se začne brousit, připevní se otolit k podložce. Brousí se na brusném kameni, suchém nebo namočeném skelném papíru nebo dalších brusných kotoučích, podložkách. Je lepší brousit otolit ručně, kvůli větší přesnosti a kvalitě preparátu. Během broušení je důležité pozorovat postup na obroušené ploše a najít tu plochu, kde se vyskytuje jádro otolitu, a tudíž jsou vidět všechny přírůstky. Po nalezení této plochy otolit otočíme a brousíme ho z druhé strany.

Výběr brousící techniky (čím brousit, jakou metodu použít, jestli lepidlo nebo konzervant) závisí na účelu mikrostrukturální analýzy, laboratorních možnostech, individuálních možnostech otolitů a mikrostrukturálních rozdílech mezi druhy a jednotlivými životními cykly. Například lepidlo a broušení je rychlejší, spotřebuje se méně materiálu a dovoluje podrobit otolity mikrostrukturální analýze za několik minut nebo hodin. Oproti tomu použití konzervantu a broušení vyžaduje minimálně den, než se může přistoupit k analýze, ale dovoluje nám přesnější umístění otolitu tak, že můžeme zbrousit jakoukoli plochu (i více ploch v jednom otolitu), která je rovná a lesklejší. Technika lepidlo a broušení se používá k analýze sagittální plochy (Secor et al. 1991).

5. Možnosti využití rybích otolitů při studiu životního prostředí

Vědci po dlouhou dobu používali pouze annuli (roční přírůstky otolitů) k určení stáří ryby. Tato metoda je velice přesná, ale nemůže se použít ke zjištění stáří rybích larev na dny. Objev denních přírůstků a mikrostruktury otolitů představuje na začátku 21. století nový trend ve výzkumu otolitů. Dovoluje daleko lépe odhadnout denní, sezónní a roční věk ryby, v některých případech Salmonidae - lososovití) i přesný den líhnutí (Radtko et al. 1996 podle Marshall and Parker 1982). Denní přírůstky na otolitech a jejich využití v mikrostrukturální analýze poprvé zmínil v roce 1971 Giorgio Pannella, geolog z university v Yale.

V průběhu posledních třiceti let vzniklo velké množství studií, které postupně odkrývají fascinující modely, které se zabývají rozmanitostí otolitů nejenom na úrovni jednotlivých druhů v různých životních cyklech ryb, ale také zpracovávají a objasňují, jak ryba vnímá zvuk a některé demografické a populační modely, jako např.: dlouhověkost a vynechání přirozeného pravidelného tření, migraci a populační strategie. Odkrývají nám také události, které se odehrály na začátku života ryby, můžeme z nich vyčíst jejich ekologické ohrožení a fyziologické schopnosti (Secor 2010). Podrobné studie zabývající se otolity a soustřeďující se na proces denních přírůstků dokonce odhalily, že při umělé změně podmínek (teplota, světelný režim, množství potravy) jsou přírůstky odlišné. Tyto změny pozorované během manipulace s vnějšími podmínkami se ukázaly užitečné pro nastavení ideálních podmínek k růstu (Geffen 1983).

5.1. Mikrostrukturální analýza otolitů

Mikrostrukturální analýza otolitů je během posledních deseti až patnácti let využívána nejčastěji. Největší podíl na výzkumu mají denní přírůstky otolitů, které jsou využívány na popis raného vývoje jednotlivých druhů ryb, zejména u výzkumů zaměřených na dobu tření, rychlost růstu a dobu, kdy ryba setrvává ve stádiu pelagické larvy. Další výzkumy porovnávají rychlost růstu a dobu tření s jinými jedinci mladých ryb stejného druhu v jiné lokalitě, kvůli možnému působení podmínek životního prostředí, ve kterém žijí. Další využití mikrostruktury otolitů je možné pro potvrzení věku ryb (Campana 2005).

Denní přírůstky se zkoumají podle velikosti pod světelným mikroskopem nebo pod elektronovým mikroskopem. Pro úspěšné získání informací z otolitů je důležitá odpovídající znalost jejich mikrostruktury a jejich důkladná příprava, která je popsána v jedné z předešlých

kapitol, aby určení věku a růstu bylo co nejspolehlivější. Také je potřeba se vyvarovat chyb, které vznikají při čtení jiných přírůstků než denních. Existují totiž občasné přírůstky, které vypadají velmi podobně jako ty denní. Nehledě na metodologické aspekty a různé interpretace opravdových denních přírůstků může být rozpoznání a čtení často velmi složité, zejména pokud není otolit dobře vyčištěný. Navíc, morfologické, mikrostrukturální a další rysy otolitů nejsou definovány podle jednotlivých druhů, ale často se mění s odlišnými životními cykly, se změnami lokality a prostředí na úrovni jednotlivců (Islam et al. 2009). Nicméně ze správně uskladněného otolitu vyčteme všechny denní přírůstky s přesností jednoho až dvou dnů.

Jakým způsobem se dá využít mikrostrukturní analýza otolitů ve studiích zaměřených na životní prostředí popíši v další kapitole. Pro tuto kapitolu jsem vybrala článek, který se věnuje době trvání larválních stádií, věku a růstu odvozených z mikrostruktury otolitů. Typ článků, které jsou zaměřené na věk a růst larev má jasnou strukturu. V první části se popisuje druh ryby, čím je ryba pro danou lokalitu výjimečná, a po jak dlouhou dobu výzkum probíhal, jestli už někdy v minulosti proběhl výzkum na daný druh ryby, jaká jsou úskalí a cíl výzkumu. V druhé části se popíši metody a materiály, které byly při výzkumu použity a v dalších částech následují výsledky a závěr utvořený na jejich základě.

Článek, který jsem si vybrala se zabývá mikrostrukturou otolitů japonského mořského okouna (*Lateolabrax japonicus*), který nemá český název. Vybrala jsem si ho, protože vysvětluje a projednává důležitost mikrostruktury otolitů při výzkumech týkajících se věku a růstu larev a juvenilních ryb a také proto, že japonský mořský okoun je velmi důležitá ryba pro komerční a rekreační rybolov na východním pobřeží Asie a je vzorem amfidromního způsobu života. Bezprostředně po vylíhnutí putuje do slané vody. Jako juvenilní stádium migruje zpět do sladkých vod, kde dospívá a kde probíhá jeho tření. Díky tomuto způsobu života je to ideální ryba pro výzkum larvální ekologie ryb (Islam et al. 2009).

V článku se řeší otázka jaký otolit by se měl pro výzkum použít, jestli sagitta nebo lapillus a jestli pravý nebo levý. Výzkum ukázal, že pro stanovení věku a růstu je lepší sagitta, protože jednotlivé denní přírůstky jsou v ní jasněji viditelné. Díky tomu lze získat preciznější a jednoznačnější výsledek než u lapillu. K analýze můžeme použít jak pravý, tak levý otolit, protože zde se nenašly žádné zásadní odlišnosti.

Dalším objektem zkoumání je doba vzniku prvního denního přírůstku, který je důležitý pro přesné stanovení věku. Jedna hypotéza (Matsumiya et al. 1985) uvádí, že první přírůstek se formuje v době líhnutí, zatímco jiná (Ohta 2004) se přiklání k teorii, že vzniká čtyři dny před líhnutím, kdy je ryba poprvé nakrmená. Aby se zjistilo, kdy dochází k tvorbě prvního přírůstku, bylo chyceno několik larev a juvenilních ryb z přírody, které byly

zakonzervovány v 99% alkoholu. U těchto exemplářů nebyl znám věk. Potom se z umělé líhně vzalo několik vzorků larev zrovna vylíhnutých a deset dnů starých. Tyto larvy byly také zakonzervovány v 99% alkoholu. Od všech byly vyjmuty otolity (sagitta a lapillus u juvenilních stádií a pouze sagitta u larev). Po přípravě otolitu k analýze byly velmi pečlivě spočítány denní přírůstky. Zjistilo se, že sagitta má více přírůstků jiných než denních, na rozdíl od lapillu, a že první přírůstky vznikají v době prvního krmení (Islam et al. 2009). Jak vypadají jednotlivé denní přírůstky japonského okouna mořského pod mikroskopem je zřejmé z Obrázku č. 5.

a) Mikrostrukturální analýza a její využití při studiu životního prostředí

Mikrostrukturální analýza se v minulosti používala zejména k získání údajů týkajících se věku a rychlosti růstu larev a juvenilních ryb, aby mohly být sestavovány demografické strategie a populační růsty na úrovni druhů. S postupem času se vědci začali více zajímat o ekologické a oceánografické procesy, které se dostaly do popředí zájmu (Sponaugle et al. 2011).

Mikrostrukturální analýza spolu s ostatními vědními obory odkrývá, jak okolní podmínky ovlivňují růst larev a juvenilních stádií ryb. Dále zkoumá potřeby okolního prostředí, které vedou k větší schopnosti přežití larev, mechanismy larválního přenosu, dynamiku populace a rozšíření druhu, jednotlivé pohyby, ke kterým dochází mezi jednotlivými životními cykly, a jaká specifika potřebují juvenilní stadia jednotlivých druhů pro přežití. V uplynulých desetiletích však proběhly změny i v oblasti této rybářské správy. Nejen, že se nezaměřuje na ekologii jednotlivých druhů, která je stále velmi potřebná k jejich úplnému porozumění, ale pojetí managementu se stalo mnohem komplexnějším - založené na ekosystému jako celku. Do této správy se zahrnují ostatní živočišné a rostlinné druhy, lokality jako celek, potřeba člověka a socioekonomické faktory (Sponaugle et al. 2011 podle McLeod and Leslie 2009). Nápad, jak zlepšit současnou situaci, si žádají mohutného přispění vědy z různých vědních oborů, např.: pro oceány z fyzikální oceánografie, i pro ostatní vody než jsou oceány z populační dynamiky larev a mezidruhových interakcí (predátor-kořist). Tyto výsledky se dají využít pro management jednotlivých nádrží nebo u oceánu pro management pobřežní zóny, pro celkovou ekonomii a socioekonomické omezení jednotlivé lokality. Dodnes neexistuje přímá metoda k získání základních biologických a ekologických údajů pro určitý druh. Dříve se používaly pouze údaje získané od ryb, druhů a populací starších jeden rok. Avšak znalost a schopnost rozeznat jednotlivé denní přírůstky u larev posunula celkovou

znalost ekologie ryb dopředu. Díky každodenním přírůstkům, které nám dovolují objasnit ekologické, v oceánech oceánografické procesy, lze zjistit důležité informace, které mohou být využity na obnovu populace ryb ať už v nádržích nebo v oceánech. Velmi důležité je, že tyto procesy neovlivňují pouze populace ryb, ale působí také na mnoho dalších rostlinných a živočišných organismů. Abychom úplně porozuměli těmto procesům a mohli navrhnout správný management, potřebujeme pro danou oblast velké množství údajů ke zpracování.

V další části uvedu jednotlivé faktory, které ovlivňují larvální a juvenilní stádia ryb a které se dají vyčíst z mikrostruktury otolitů (Sponaugle et al. 2011).

◆ Teplota

Prvním faktorem je teplota. Mikrostrukturální analýza otolitů umožňuje přesnou nebo alespoň relativní interpretaci teplot okolní vody a potažmo náhled na to, jak teplota ovlivňuje rychlost růstu larev ryb (Sponaugle et al. 2011).

Nenašla jsem žádný článek, který by se týkal výzkumu larválních stádií v závislosti na teplotě u sladkovodních ryb. Nicméně, skvělý příklad takového výzkumu je článek, který se zabývá hodnocením denních přírůstků sardele obecné (*Engraulis encrasicolus*) vzniklých při různých teplotních podmínkách. Tato práce zkoumala, kdy vzniká první denní přírůstek (stejně jako u předchozího příkladu, zda v době líhnutí nebo prvního nakrmení). Hlavní náplní práce je, čím a jak je ovlivněna šířka denního přírůstku. Uvažuje se, že šířku ovlivňuje okolní teplota, dostupnost potravy a tělesný růst. Zjistilo se, že čím je teplota nižší, tím je denní přírůstek užší a že teplota souvisí i s tělesným růstem larvy (Aldanondo et al. 2008). Díky této znalosti můžeme odhadnout teplotu, která bude pro daný druh vhodná pro jeho optimální růst nejen v mořích a oceánech, ale i ve sladkovodních nádržích.

Teplota se ukázala jako velmi důležitý faktor při procesu tření ryb. Z jednotlivých denních přírůstků adultních ryb lze vyčíst sezónní události a také čím bylo ovlivněno a jak probíhalo přirozené tření (Margonski et al. 2010).

◆ Promíchávání vodních hmot

Další jev, o kterém se v krátkosti zmíním a který dokážeme vyčíst z mikrostrukturální analýzy, se týká proudění vodních hmot. Proudění je velmi významné v přímořských oblastech. Jeho vlivem se měnila salinita okolní vody, která ovlivňuje růst ryb. U kněžika

dvoupruhého (*Thallasoma bifasciatum*), který žije v Karibském moři se zjistil pomalejší růst larev u těch jedinců, kteří byli na delší dobu vystaveni nižší salinitě díky proudu z Amazonky (Sponaugle and Pinkard 2004).

◆ Vzdálenost larvy od břehu a dostupnost kořisti

Čtení každodenních přírůstků lze také uplatnit při odlišení larev ryb, které žily dál od břehu nebo neměly dostatek kořisti od těch, které žijí u břehu nebo s dostatkem kořisti. Analýza otolitů japonské ančovičky (*Engraulis japonicus*) dokazuje, že hlavní koncentrace rybích larev a současně rychlost jejich růstu klesá se vzdáleností od břehu. Tento jev není závislý na teplotě, ale na koncentraci buchanky, která je hlavní kořist japonské ančovičky a která se vyskytuje v oblasti břehů (Takahashi et al. 2001). To, že denní přírůstky jsou užší u larev ryb, které mají méně kořisti nebo žijí dál od břehu, dokazuje i výzkum běžné ryby žijící poblíž útesů Floridy. Na západní straně poloostrova jsou rybí larvy větší, protože koncentrace potravy je větší. Tyto ryby mají širší přírůstky než ty na východní straně poloostrova s nižší koncentrací kořisti (Sponaugle et al. 2009). To, že optimální množství potravy ovlivňuje celkový vzrůst rybí larvy, který je velmi důležitý pro její přežití (viz. selektivní mortalita), dokazuje výzkum mořského okouna (*Dicentrarchus labrax L.*). Tato ryba tvoří velmi důležitou součást ekosystému ve Středozezemním moři a Atlantském oceánu při evropských březích. Byl proveden pokus s rybími larvami, kdy každá skupina larev dostávala jiné množství potravy. První skupina byla optimálně krmená, druhá nebyla krmená vůbec a třetí byla krmená až od druhého dne larválního života. Ukázalo se, že počet jednotlivých přírůstků se nemění s dostupností dané potravy pro larvu, ale mění se jejich šířka. Rybí larvy, které nebyly prakticky vůbec krmeny, měly znatelně užší denní přírůstky než dobře krmené larvy stejného věku. Larvy, které byly ze začátku života nekrmeny a poté ano, měly první přírůstky stejně široké jako nekrmené larvy a během jednoho týdne se tyto přírůstky rozšířily, až byly naprosto identické s přírůstky optimálně krmených larev (Aguilera et al. 2009).

◆ Selektivní mortalita

Z mikrostruktury otolitů se dá velmi dobře zjistit selektivní mortalita (úmrtnost). Z analýzy lze vyčíst, které larvy z určité skupiny ryb umírají a proč. Jeden ze způsobů zjišťování těchto údajů je věk, velikost a růst rybích larev. Přirozené odlišnosti ve věku, růstu

a ve velikosti jsou z velké části způsobeny teplotou, lokalitou a možnostmi potravy. Tyto údaje představují zásadní přísun informací pro určení mortality, která není náhodná. Larvy s odlišnými znaky a vlastnostmi mohou být více nebo méně citlivé na nedostatek potravy nebo predaci i v rámci jednoho druhu. Existuje mnoho výzkumů (např.: Fontes et. al 2011, Kerr and Secor 2010, Folkvord et al. 2010), které dokazují, že mortalita u ryb, ať už žijí podél útesů v mírném pásmu, částečně migrují ze slané vody do řek nebo žijí pouze v oceánech, závisí na velikosti larvy a juvenilních ryb v dané skupině. Malí jedinci jsou často přirozeně odstraňováni z populace. Velikost, při které larva nebo juvenilní ryba umírá, není jasně daná. Je odlišná u každé populace. Proto ryby stejného druhu z jedné lokality mají odlišnou velikost než ryby z jiné lokality a umírají při jiných velikostech. Tyto odlišnosti jsou způsobené různými okolními podmínkami. Tímto způsobem bychom mohli objasnit selektivní mortalitu u ryb i v našich nádržích.

◆ Recruitment rybí populace

Při zkoumání rybích populací je důležitý tzv. recruitment. Tento termín se používá pro identifikaci vstupu mladých jedinců do populace. Pro vědecké účely se takto označuje většinou přechod z larválního stádia do juvenilního a je měřen v určitém bodě juvenilního stádia. Mikrostruktura otolitů nám umožňuje zpětně vypočítat dobu líhnutí u jednotlivců a tak nám poskytuje celkový náhled na poměr mezi recruitmentem a vylíhnutými larvami. Přežití dané ryby je selektivní, založené na době tření a líhnutí. Srovnání těchto údajů nám dovoluje určit, jak velká část při tření ryb přispívá k růstu populace a za jakých environmentálních podmínek může dojít k jejímu zvětšení (Sponaugle 2010). Na velikost populace má hlavní vliv zejména úspěšný recruitment mladých jedinců do dospělé populace. Události týkající se úspěšného recruitmentu se mohou uvnitř druhu velice odlišovat nejen podle území, ve kterém se daný druh vyskytuje, ale i s ohledem na dočasně trvající jevy ovlivňující každé území jednotlivě. Abychom mohli sestavit strukturu populace, určit, jak se bude dál vyvíjet, a popř. navrhnout a rozšířit potřebný management daného území pro její ochranu, je potřeba porozumět těmto odlišnostem v recruitmentu. Praktické využití této metody získávání informací z otolitů nejen o době tření a líhnutí, ale i dalších informací jako délka pelagické larvy a juvenilních stádií ryb a doby osídlování, bylo využito ve výzkumu zabývajícím se ropušnicí (*Sebastes mystinus*) z kalifornského pobřeží ze dvou různých oblastí. Na základě výzkumu se ukázalo, že tyto dvě populace mají odlišnou dobu tření zhruba o dvacet dní, která je závislá na teplotě. Populace z jižnější oblasti se tře dříve. Proto je oblast osídlena nejprve

rybami z jižní oblasti a poté ze severní. Lze tedy konstatovat, že recruitment z jižní oblastí je větší, tudíž ty ryby, které se narodí dříve a vyskytují se v teplejších oblastech přežívají ve větším množství (Laidig 2010).

Z tohoto přehledu je jasně zřetelné, že mikrostrukturální analýza otolitů nám může odhalit zásadní ekologické procesy, s kterými se ryba potýká ve svém larválním stádiu. Tento způsob získávání údajů je velmi citlivý na interpretaci výsledků výzkumu. Pokud ale tuto metodu používáme správně, můžeme vyčíst unikátní a velmi hodnotné údaje k odkrytí celé ekologické minulosti ryby, které s vyhodnocením údajů získaných z jiných odvětví mohou být použity na návrh vhodného managementu, který zlepší současnou situaci a zaslouží se o udržení našich přírodních zdrojů a k zachování biodiverzity.

5.2. Chemická analýza otolitů

Ve vodním prostředí, ať už je to slaná nebo sladká voda, se nachází okolo 78 prvků, ale pouze některé z nich, často ty méně běžné, se ukládají v otolitech, kde jsou uchovány na jednom místě po celý život ryby. Různorodost pobřežních a vnitrozemních vod je veliká, proto se chemické složení otolitů používá jako indikátor výskytu, např. migrujících ryb. Prvky jako je vápník (Ca), stroncium (Sr) a hořčík (Mg) poukazují na tradiční oblasti, kde se podle jejich procentuálních zastoupení a hlavně poměru Sr:Ca dá odhadnout salinita. Barium (Ba), zinek (Zn) a kadmium (Cd) upozorňují na oblast chudou na živiny a obohacenou vodou z větších hloubek. Další skupinou prvků jsou ty, které spojujeme s antropologickou činností. Řadí se sem většinou rtuť (Hg) a olovo (Pb). Složení vody je ovlivněno mnoha faktory, např. vymýváním prvků proudem řeky, regionální variabilitou, různými vstupy prvků do vody, vulkanickou aktivitou, znečištěním, biologickou aktivitou a meziročními odlišnostmi ve složení. I přes tento veliký počet ovlivňujících elementů lze podle poměru prvků a zastoupení jednotlivých stopových prvků, isotopů nebo radioaktivních prvků odhadnout přesné místo výskytu ryby během jejího života (Campana 2005).

Chemická analýza se používá ve většině případů u ryb, které migrují ze sladkých do slaných vod a opačně. Jak se dá využít analýza pro účely ekologické, je v práci, která se zabývá výzkumem migračních cest platýsa bradavičnatého (*Platichthys flesus*), který žil i v našich řekách, ale už vyhynul. Hojně se vyskytuje v Atlantickém oceánu podél pobřeží od Norska až po Portugalsko a v ústí řek. V Baltském moři existují dvě různé populace, které mají dvě odlišné metody rozmnožování. První populace produkuje pelagické jikry hlavně v oblastech vysoké salinity a v hlubších mořích, zatímco druhá má jikry demersální v místech s

nižší salinitou při pobřeží a na mělčině. Jelikož platýsi mají stejný systém získávání potravy v pobřežních oblastech, migrují z jednoho místa na druhé. Pomocí analýzy stopových prvků usazených v otolitech (zejména v sagittě) mohou být tyto migrační cesty odhaleny. Stopové prvky se v otolitech usazují úměrně jejich koncentraci v okolní vodě a mohou být použity k odhalení míst pohybu ryby. Výzkum probíhal za předpokladu, že koncentrace stroncia (Sr) je podstatně vyšší v mořské vodě než ve vodách brakických a sladkých. Výsledky této analýzy odhalily celkovou ekologii a migraci platýsa a představují důležitá data pro rybářskou správu, která je může použít ke zlepšení celkového managementu a ochrany této ryby (Morais et al. 2011).

V České republice se využití chemické analýzy řeší zatím pouze teoreticky. Tato metoda by se dala využít v případě dostatečně různorodého geologického podloží ke zjištění místa vykulení rybích larev a sledování jejich následného pohybu v řekách (teoreticky i v nádržích), ke zjištění původu ryb při nedobrovolných migracích, ke kterým dochází např. při povodních nebo ke zjištění původu ryb při napouštění vody do nových nádrží, např. důlní jámy. Dá se také využít ke zjištění zda se sem ryby dostaly s napouštěcí vodou nebo byly vysazeny nelegálně z jiné oblasti. Tato metoda je vhodná i pro monitoring znečištění prostředí a to i zpětně u dlouhověkých ryb a paleontologických nálezů.

5.3. Otolit jako značka

Jak jsem psala v předešlých kapitolách, otolity mají schopnost zaznamenávat složení okolní vody. Toho lze využít při tzv. značkování otolitů (anglicky: mass marking). Tato technika využívá buď teplotní změny nebo chemikálie, které jsou schopny navázat vápník. Oba tyto faktory mají tu schopnost zanechat na otolitu jasně viditelné nebo chemické znamínko v době aplikace. Velkou výhodou této metody je označení tisíců, někdy i miliónů ryb ve stejnou dobu s malými náklady (Campana 2005).

U většiny případů se k označování používají uměle odchované ryby ze sádek, ale v roce 1999 proběhlo první rozsáhlé chemické značkování u ryb žijících v přírodě. Systém spočíval ve sběru rybích jiker u ryby z korálového útesu. Jikry se vložily do plastového pytle, kde byl roztok tetracyklinu a ponechaly se tam hodinu. Takto označené ryby se použily pro další výzkum, který se týkal rozptýlení populace (Jones et al. 1999).

Alizarin, oxytetracyklin, stroncium (Sr) a další stabilní izotopy prvků jako barium (¹³⁷Ba) a hořčík (Mg) jsou chemikálie, které se mohou použít pro označení uměle vysazených ryb. Tato technika se hojně využívá na rehabilitaci ohrožených druhů. Uměle vylíhnuté a

označené larvy stejného druhu, jako je druh ohrožený, se introdukují do přirozeného prostředí. Označení těchto ryb je velice důležité pro určení zpětné efektivity introdukce (Lochet et al. 2011, Woodcock et al. 2011). Jak vypadá označený otolit se můžete podívat v obrazové příloze (Obr. č. 6).

V České republice se tato metoda použila jednak k introdukci uměle vypěstovaných larev a následné kontrole úspěšnosti dané introdukce a zároveň ke zjištění přirozeného výtěru candáta a následného recruitmentu ve vodní nádrži (Blabolil, Biologické centrum AV ČR, Hydrobiologický ústav, ústní sdělení).

5.4. Určování stáří ryb

Z otolitů se dá vyčíst stáří ryb dvojím způsobem. Jeden je popsán v kapitole mikrostrukturální analýza, kde se počítají jednotlivé denní přírůstky. Těto metody se využívá hlavně k určení stáří jednotlivých rybích larev. Otolity ale mohou být i důležitým nástrojem k určování ryb starších než jeden rok. Tradičně se používají pro zjištění věku ryby s přesností na léta šupiny, méně pak ploutevní paprsky, obratle nebo skřelové kosti. Otolity se ukázaly jako daleko přesnější metoda, zvláště u druhů jako je třeba okoun, jehož starší jedinci mají velmi nečitelné šupiny. Během jednoho výzkumu byly použity otolity a šupiny z 20 odlišných druhů ryb různého stáří. Každý otolit a šupina se dala přečíst dvakrát po sobě dvěma lidmi (jeden otolit a šupina byly čteny celkem čtyřikrát) a při nesouhlasném výsledku ještě třetí osobě. Při čtení otolitů se 100 % prvních výsledků shodovalo s druhými výsledky a 100 % se shodovalo i mezi jednotlivci v první a druhé skupině. U šupin bylo první procento shody také veliké (89 %), ale mezi jednotlivci shoda dosahovala 80 % (Halles and Belk 1992, Loverrebarbieri et al. 1994, Campana 2001). U některých studií jiných druhů ryb je však procento přesnosti u šupin výrazně menší (Zimonas and McMahon 2009, Wahl et al. 2009). Z toho je patrné, že stanovení věku pomocí otolitů je přesnější než jeho stanovení pomocí ostatních metod.

Typické otolity mají neprůsvitné jádro a pak se střídají průsvitné a neprůsvitné pruhy (translucent and opaque zone), které nazýváme annuli. Sečtení neprůsvitných pruhů, které bývají souvisle po celé délce otolitu, nám odhalí přesný věk ryby (Barbieri et al. 1994). Pro představu, jak tyto zóny vypadají, jsem zvolila obrázek sagitty druhu *Micropogonias undulatus* z čeledi smuhovitých, který dosáhl osmi let (Obr. č. 7).

Znalost stáří jednotlivých velikostí ryb nám poskytuje cenné informace o populační dynamice. Z výsledků lze zjistit, jestli daná populace stárne, mládne nebo naopak se nemění.

V České republice by se dala tato metoda uplatnit na ryby, jak už jsem výše zmiňovala, jako je okoun, u kterého jsou velmi špatně čitelné šupiny, zvláště u starších jedinců, nebo i na další druhy ryb kvůli vyšší kvalitě získaných údajů.

6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo s pomocí zahraničních zdrojů literatury a různých výzkumů, které probíhaly, navrhnout, jak by se dala data získaná z otolitů využít v řekách, nádržích a přehradách v České republice. Během psaní této práce jsem se snažila shromáždit co nejvíce primárních zdrojů, které nějak souvisí s otolity a jejich využitím při studiu životního prostředí. Při vyhodnocování jednotlivých informací jsem se snažila vybrat pouze ty metody, které by se daly nějakým způsobem uplatnit při výzkumu otolitů na území České republiky.

V bakalářské práci jsem hledala odpovědi na otázku: Jaké využití mají otolity při studiu životního prostředí ve světě a jakým způsobem a které znalosti by se daly aplikovat při studiu ryb v České republice?

Otolity jsou jedinečné struktury, které se nacházejí po obou stranách hlavy ryby v jejich vnitřních uších. Existují celkem tři páry otolitů, které se nazývají sagitta, lapilus a asteriscus. Každý otolit má jiný tvar, který se liší i u každého živočišného druhu, někdy i jedince. Jejich jedinečnost je daná jejich schopností vázat do sebe prvky z okolní vody ve velmi pravidelných intervalech (dnech, rocích). Této skutečnosti se využívá jak v biologii, tak i ekologii.

Z výše uvedených informací je patrné, že nejen v České Republice ale v celé Evropě se dosud nedoceniло použití mikrostrukturální analýzy, která má hned celou řadu uplatnění. Ta se kromě použití k získání údajů týkajících se věku a rychlosti růstu rybích larev a juvenilních ryb v dnešní době využívá i k získání informací, které lze spolu se správným managementem použít pro celkové zlepšení situace nejen na úrovni druhu, ale celých ekosystémů. Mikrostrukturální analýza by odhalila selektivní mortalitu a recruitment dané populace v nádrži nebo řekách, dále jaké teploty jsou pro rybí larvu snesitelné, jaké množství kořisti měla k dispozici, jaký byl její transport a celková ekologická minulost.

Chemická analýza by pomohla se zjištěním místa vykolení rybích larev a následným pohybem, s původem ryb při nedobrovolných migracích, jakými jsou povodně, nebo při

určení původu v nově napuštěných nádržích (důlní jámy apod.). Zároveň by otolity mohly sloužit k monitoringu znečištění vod a to i zpětně z dlouhověkových ryb a paleontologických nálezů.

Dalším využitím otolitu je jeho použití jako značky. Toto použití se v našich podmínkách v současné době již testuje v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích. Zdá se, že mass marking by mohl být velmi účinnou kontrolou prováděné reintrodukce druhů do nádrží nebo ke zjišťování přirozeného výtěru a recruitmentu v nádržích.

Poslední metoda, kterou jsem se v práci zabývala, bylo určení stáří ryb starších než jeden rok právě pomocí otolitů. Tato metoda je velmi přesná a slouží nám k odhalení populačních změn v dané skupině ryb a velice by pomohla u druhů, které mají nečitelné šupiny (okoun). Nutno podotknout, že metoda získávání informací z otolitů je velmi pracná, nicméně z práce je patrné, že informace získané díky otolitům mají velký potenciál a byly by nesmírně cenné pro udržení a zachování celých ekosystémů a biodiverzity v našich nádržích a řekách.

7. Použitá literatura a elektronické zdroje

7.1. Použitá literatura

1. Aguilera, B.; Catalan, I.,A.; Palomera, I.; Olivar, M.,P.; březen 2009; **Otolith growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) larvae fed with constant or varying food levels;**
2. Aldanondo, N.; Cotano, U.; Etxebeste, E.; Irigoien, X.; Alvarez, P.; de Murguía, A.,M.; Herrero, D.,L.; září 2008; **Validation of daily increments deposition in the otoliths of European anchovy larvae (*Engraulis encrasicolus L.*) reared under different temperature conditions;** FISHERIES RESEARCH; Vol.: 93; Issue: 3; p.: 257-264
3. Arai, T; Hirata, T; únor 2006; **Differences in the trace element deposition in otoliths between marine- and freshwater-resident Japanese eels, *Anguilla japonica*, as determined by laser ablation ICPMS;** ENVIRONMENTAL BIOLOGY OF FISHES; Vol.: 75; Issue: 2; p.: 173-182
4. Barbieri, L.,R.; Chittenden, M.,E.; Jones, C.,M.; leden 1994; **Age, growth, and mortality of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, In the Chesapeake Bay-region, with a discussion of apparent geographic changes in population dynamics;** FISHERY BULLETIN; Vol.: 92; Issue: 1; p.: 1-12
5. Borelli, G.; Mayer-Gostan, N.; De Pontual, H.; Boeuf, G.; Payan, P.; prosinec 2001; **Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*),** CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL, Vol.: 69. Issue: 6, p.: 356-364
6. Campana, Steven, E.; 1999, **Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications,** MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES, Vol.: 188, p.: 263-297
7. Campana, Steven, E.; květen 2001; **Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods;** Journal of FISH BIOLOGY; Vol. 59; p.:197-242
8. Campana, Steven, E.; 2005, **Otolith science entering the 21st century,** Marine and Freshwater Research, Vol.: 56, Issue: 5, p.: 485-495

9. Edmonds, J.S.; Caputi, N.; Lenanton, P., C., J.; Morita, M.; 1992; **Trace elements in the otoliths of yellow-eye mullet (*Aldrichetta forsteri*) as an aid to stock identification**; FISHERIES RESEARCH, Vol.: 13, Issue: , p.: 39-51
10. Folkvord, A.; Koedijk, R.,M.; Lokoy, V.; Imsland, A.,K.; prosinec 2010; **Timing and selectivity of mortality in reared Atlantic cod revealed by otolith analysis**; ENVIRONMENTAL BIOLOGY OF FISHES; Vol.: 89; Issue: 3-4; p.: 513-519
11. Fontes, J.; Santos, R.,S.; Afonso, P.; Caselle, J.,E.; leden 2011; **Larval growth, size, stage duration and recruitment success of a temperate reef fish**; JOURNAL OF SEA RESEARCH; Vol.: 65; Issue: 1; p.: 1-7
12. Geerinckx, Tom; Brunain, Marleen; Adriaens, Dominique; 2007; **Development of the Osteocranium in the Suckermouth Armored Catfish, *Ancistrus cf. triradiatus* (Loricariidae, Siluriformes)**, JOURNAL OF MORPHOLOGY, Vol.: 268, p.: 254-274
13. Geffen, A., J.; leden 1983, **The deposition of otolith rings in Atlantic Salmon, *Salmo salar L.*, embryos**; J. Fish Biol., Vol.: 23, p.: 467-474
14. Hales, L.,S.; Belk, M.,C.; listopad 1992; **Validation of otolith annuli of Bluegills in a Southeastern thermal reservoir**; TRANSACTIONS OF THE AMERICAN FISHERIES SOCIETY; Vol.: 121; Issue: 6; p.: 823-830
15. Harrington, R.W., Jr.; 1955, **The Osteocranium of the American Cyprinid fish, *Notropis bifrenatus*, with annotated synonymy of teleost skull bones**, Copeia 1955, p. 267-291
16. Hoff, G.,R.; Freiman, L., A.; březen 1995; **Environmentally-induced variation in elemental composition fo red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths**; BULLETIN OF MARINE SCIENCE; Vol.: 56; Issue: 2; p.: 578-591
17. Islam, Md., S.; Ueno, M.; Yamashita, Y.; srpen 2009; **Otolith microstructure of Japanese sea bass larvae and juveniles: interpretation and utiliti for ageing**, JOURNAL OF APPLIED ICHTHYOLOGY, Vol.: 25, Issue: 4, p. 423-427
18. Jones, G.,P.; Milicich, M.,J.; Emslie, M., J.; Lunow, C.; 1999; **Selfrecruitment in a coral reef fish population**; Nature, Vol.: 402; p.: 802-804
19. Kerr, L.,A.; Secor, D.,H.; prosinec 2010; **Latent effects of early life history on partial migration for an estuarine-dependent fish**; ENVIRONMENTAL BIOLOGY OF FISHES; Vol.: 89; Issue: 3-4; p.: 479-492
20. Ladich Friedrich, Popper Arthur, N.; 2004, **Paraller Evolution in Fish Hearing Organs**; p. 95-128, V Manley, Geoffrey, A.; Popper, Arthur, N.; Fay, Richard, R.

- (eds.); Evolution of the Vertebrate Auditory System, Springer Handbook of Auditory Research, Springer-Verlag, NY
21. Laidig, T.,E.; říjen 2010; **Influence of ocean conditions on the timing of early life history events for blue rockfish (*Sebastes mystinus*) off California**; FISHERY BULLETIN; Vol.: 108; Issue: 4; p.: 442-449
 22. Lochet, A.; Jatteau, P.; Gessner, J.; duben 2011; **Detection of chemical marks for stocking purposes in sturgeon species**; JOURNAL OF APPLIED ICHTHYOLOGY; Vol.: 27; Issue: 2; p.: 444-449
 23. Lowenstein, O.; 1971, **The labyrinth**, p. 207-240, V W.S. Hoar and D.J. Randall (eds.), Fish Physiology, Vol.: 5, Academic Press, NY
 24. Loverrebarbieri, S.,K.; Chittenden, M.,E.; Jones, C., M.; červenec 1994; **A comparison of a validated otolith method to age weak fish *Cynoscion regalis*, with the traditional scale method**; FISHERY BULLETIN; Vol.: 92 ; Issue: 3; p.: 555-568
 25. Margonski, P.; Hansson, S.; Tomczak, M.,T.; Grzebielec, R.; říjen-prosinec 2010; **Climate influence on Baltic cod, sprat, and herring stock-recruitment relationships**; PROGRESS IN OCEANOGRAPHY; Vol.: 87; Issue: 1-4; Special Issue: Sp. Iss. SI; p.: 277-288
 26. Marshall, S.L.; Parker, S.S.; 1982, **Pattern identification in the microstructure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) otoliths**, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, Vol.: 39, p.: 542-547
 27. Matsumiya, Yoshikaru; Masumoto, Hideto; Tanaka, Masaru; 1985, **Ecology of Ascending Larval and Early Juvenile Japanese Sea Bass in the Chikugo Estuary**, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Vol. 52, Issue: 12, p.: 1955-1961
 28. McLeod, K.; Leslie, H.; 2009; **Ecosystem-based management for the oceans**; Island Press, Washington
 29. Morais, P.; Dias, E.; Babaluk, J.; Antunes, C.; únor 2011; **The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: Ecological implications and fishery management**; JOURNAL OF SEA RESEARCH; Vol.: 65; Issue: 2; p.: 235-246
 30. Nolf, D.; 1985, **Otolithi piscium**, p.: 1-26, V H.P. Schultze (ed.), Handbook of Paleoichthyology, Vol.: 10, Gustav Fisher Verlag, NY

31. Ohta, T.; 2004, **Ecological studies on the river ascending migration of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* in Ariake Bay, on the basis of otolith information**, PhDDiss, Kyoto University, Kyoto
32. Pannela, G.; 1971, **Fish otoliths: Daily growth layers and periodic patterns**, Science (Wash. D.C.), 173: 1124-1127
33. Payan, P.; Kossman, H.; Watrin, A.; Mayer-Gostan, N.; Boeuf, G.; 1997, **Ionic composition of endolymph in teleost: origin and importance of endolymph alkalinity**, J. Exp. Biology, Vol.: 200, p.: 1905-1912
34. Popper, Arthur, N.; Fay, Richard, R.; Platt, Christopher; Saud Olav; 2003; **Sound Detection Mechanism and Capabilities of Teleost Fishes**; p. 3-39, V Collin, Shaun, P.; Marshall, Justin, N. (eds.); Sensory Processing in Aquatic Environments, University of Queensland, Brisbane, Springer-Verlag, NY
35. Popper, Arthur, N.; Ramcharitar, John; Campana, Steven, E.; 2005, **Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology**, Marine and Freshwater Research, 56, p.: 497- 504, CSIRO PUBLISHING
36. Radtke, R., L.; Shafer, D., J.; 1992, **Environmental Sensitivity of fish otolith microchemistry**, AUSTRALIAN JOURNAL OF MARINE AND FRESHWATER RESEARCH, Vol.: 43, Issue: 5, p.: 935-951
37. Radtke, R., L.; Fey, D.P.; DeCicco, A., F.; Montgomery, A.; únor 1996, **Otoliths Microstructure in Young-of-the-Year Dolly Varden, *Salvenius malma*, from american and Asian population: Resolution of Comparative Life History Characteristics**, ARCTIC, Vol.: 49, Issue: 2, p.: 162-169
38. Ren, DN, (Ren, Dongni); Li, Z, (Li, Zhuo); Gao, YH, (Gao, Yonghua); Feng, QL, (Feng, Qingling); řijen 2010; **Effects of functional groups and soluble matrices in fish otolith on calcium carbonate mineralization**; BIOMEDICAL MATERIALS; Vol.: 5; Issue: 5; Article Number: 055009
39. Roček, Z.; 2002; **Historie obratlovců**; ACADEMIA; [512 pp.]
40. Secor, David, H.; Dean, John, M.; Laban, Elisabeth, H.; 1992; **Otolith Removal and Preparation for Microstructural Examination**; p.: 19-57; V Stevenson D.,K. and Campana, S., E.[ed]; Otolith microstructure examination and analysis; Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.; 117
41. Secor, David, H.; Dean, John, M.; Campana, Steven, E.; 1995; **Glossary for Otolith Studies**, University of South Carolina PRESS, Institute for Marine Biology

- and Coastal Research, The belle W. Baruch Library in Marine Science Number 19; p.: 723-727
42. Secor, David, H.; červenec 2010; **Is otolith science transformative? New views on fish migration**; Environ Biol Fish (2010) 89; p.: 209-220; Springer Science + Business Media B.V.
 43. Sponaugle, S.; prosinec 2010; **Otolith microstructure reveals ecological and oceanographic processes important to ecosystem-based management**; Vol.: 89, Issue: 3-4; p.: 221 - 238
 44. Sponaugle, S.; Llopiz, J.,K.; Havel, L.,N.; Rankin, T.,L.; 2009; **Spatial variation in larval growth and gut fullness in a coral reef fish**; MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES; Vol.: 383; p.: 239-249
 45. Sponaugle, S., Pinkard, D.,R.; 2004; **Impact of variable pelagic environments on natural larval growth and recruitment of the reef fish *Thalassoma bifasciatum***; JOURNAL OF FISH BIOLOGY; Vol.: 64; Issue: 1; p.: 34-54
 46. Takahashi, M.; Watanabe, Y.; Kinoshita, T.; Watanabe, C.; 2001; **Growth of larval and early juvenile Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*, in the Kuroshio-Oyashio transition region**; FISHERIES OCEANOGRAPHY; Vol.: 10; Issue: 2; p.: 235-247
 47. Wahl, N.C., Phelps, Q.E., Garvez, J.E., Lynott, S.T., Adams, W.E.; 2009; **Comparison of scales and sagittal otoliths to back-calculate lengths-at-age of crapies collected from Midwestern waters**; Journal of Freshwater Ecology; Vol.: 24; Issue: 3; p.:469-475
 48. Wild, A.; Foreman, T.J.; 1980; **The relationship between otolith increments and time for yellowfin and skipjack tuna marked with tetracycline**; Inter.-Am. Trop. Tuna Comm.; Vol.: 17; p.: 509-560
 49. Woodcock, S.,H.; Gillanders, B.,M.; Munro, A.,R.; McGovern, F.; Crook, D.,A.; Sanger, A.,C.; březen 2011; **Using enriched stable isotopes of barium and magnesium to batch mark otoliths of larval golden perch (*Macquaria ambigua*, Richardson)**; ECOLOGY OF FRESHWATER FISH; Vol.: 20; Issue: 1; p.: 157-165
 50. Zymonas, N.D.; McMahon, T.E.; 2009; **Comparison of pelvic fin rays, scales and otoliths for estimating age and growth of bull trout, *Salvelinus confluentus***; Fisheries Management and Ecology; Vol.:16;Issue: 2; p.:154-164

7.2. Elektronické zdroje

1. Secor, D.H.; Dean, J.M.; Laban, E.H.; 1991; **Otolith Removal and Preparation for microstructural Examination: A Users manual**, <http://www.cbl.umces.edu/~secor/otolith-manual.html>

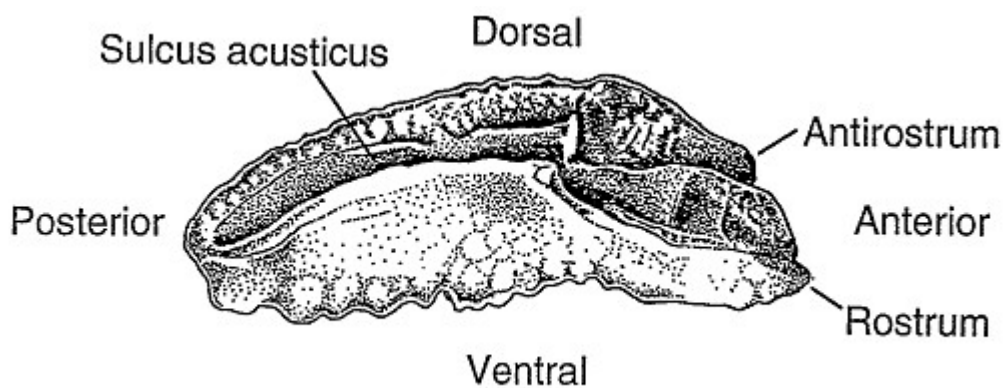
8. Přílohy

8.1 Obrazová příloha

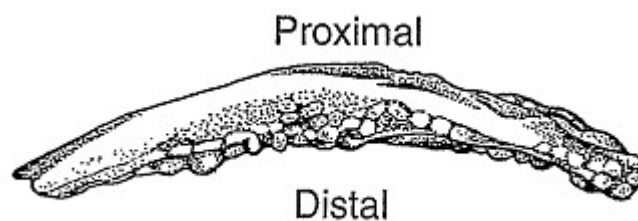
Obr. č. 1

Náhled levé sagitty z kahavaje skvrnitého (*Arripis trutta*) znázornění směru růstu a základní struktury A) proximální pohled, B) ventrální hrana. C) distální pohled, D) Dorsální hrana (Nákres vytvořil Darren Stevens, Nový Zéland, MAF Fisheries podle Secor 1995, Glossary str. 725)

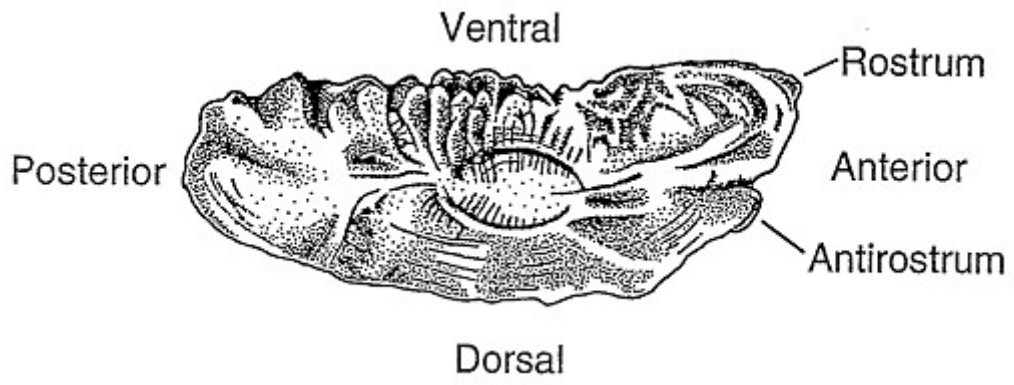
A)



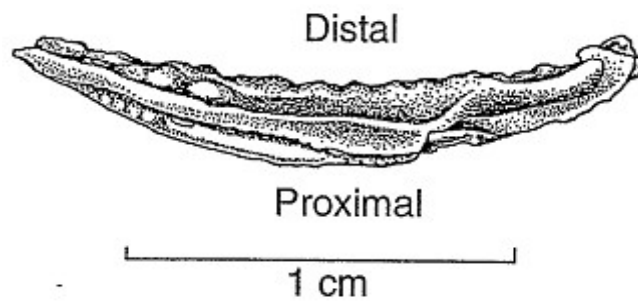
B)



C)

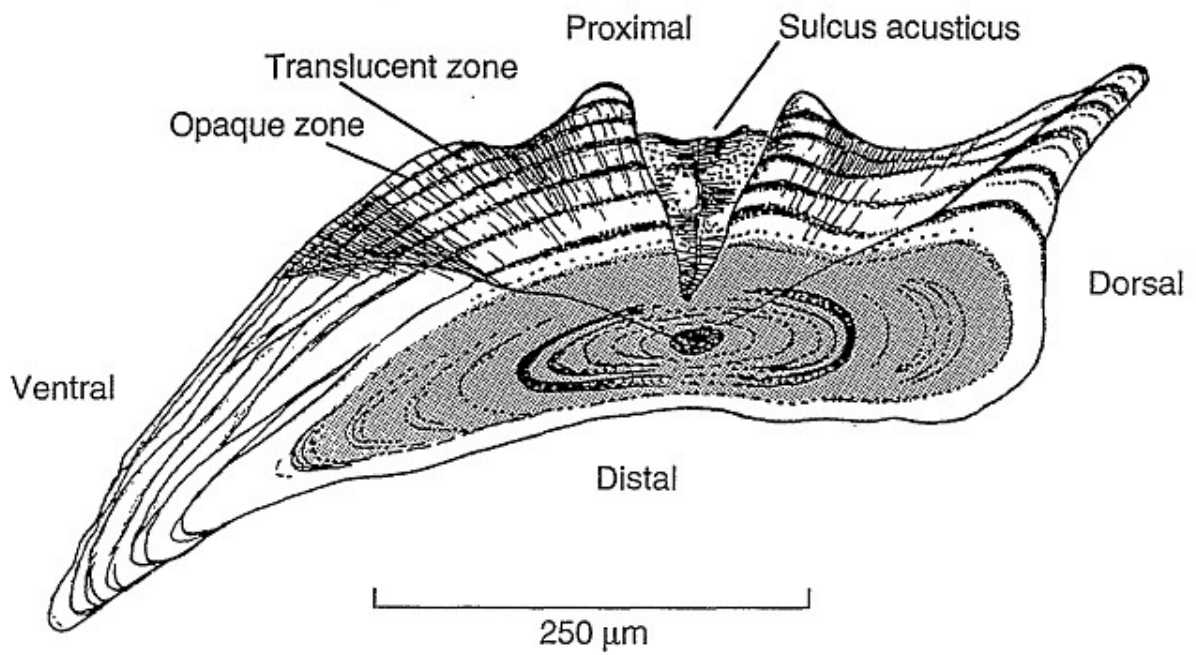


D)



Obr. č. 2

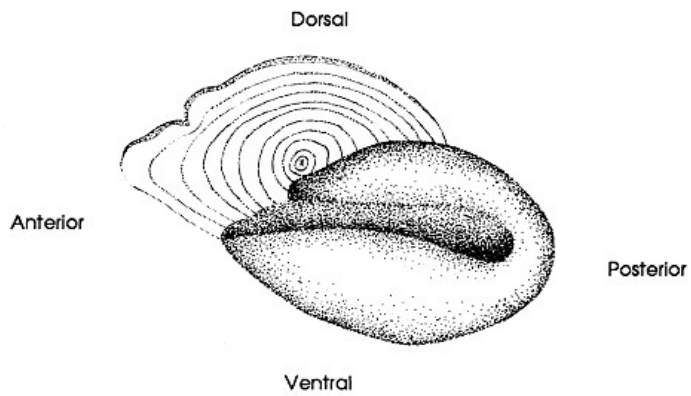
Příčný řez úzké části sagitty z kahavaje skvrnitého (*Arripis trutta*) zobrazen pod osvětlením. Tento řez je proveden skrz střed sagitty (Nákres vytvořil Darren Stevens, Nový Zéland, MAF Fisheries podle Secor 1995, Glossary str. 728)



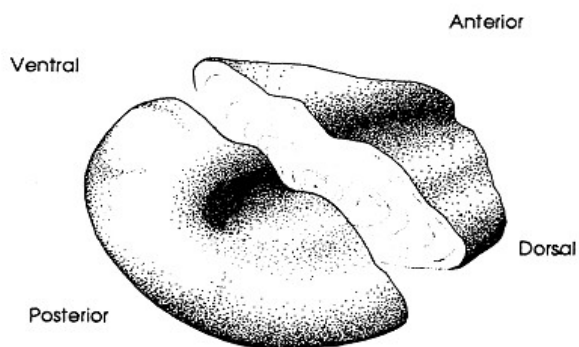
Obrázek č. 3

Sagitta - ukázka nejběžnější řezů, A) Řez sagittální plochou, B) Šikmý řez C) Řez přední plochou (Secor 1992)

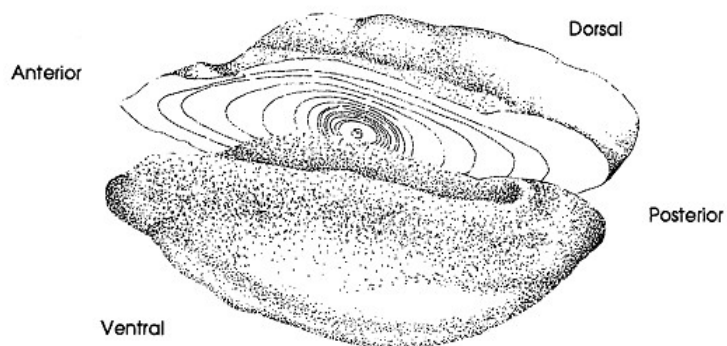
A)



B)

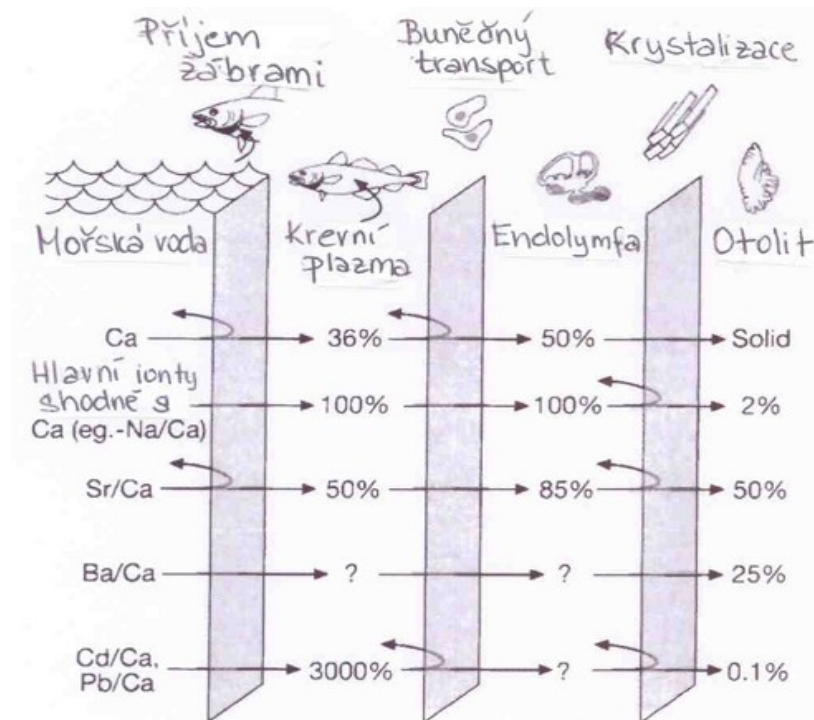


C)



Obr. č. 4

Celkový pohled transportních drah jednotlivých prvků mezi vodou a otolitem s hrubými odhady procentuálních ztrát mezi jednotlivými bariérami. Koncentrace prvků je odvozená od koncentrace vápníku. Největší procentuální ztráta je zaznamenána u prvků a iontů, které tvoří základní hmotu otolitů a nejmenší u stopových prvků. Tato procentuální ztráta je pouze pro představu. Ve skutečnosti je velmi často nepředvídatelná (Campana 1999).



Obr. č. 5

Doba líhnutí (H) a označení prvního krmení (F) na otolitech u larválního a juvenilního stádia japonského mořského okouna *L. japonicus*. Horní dvě fotografie pocházejí od larvy, u které známe věk (10 dní), bílý pruh má velikost 20 μ m

a) sagitta od larvy, která dosahuje velikosti 5,6 mm

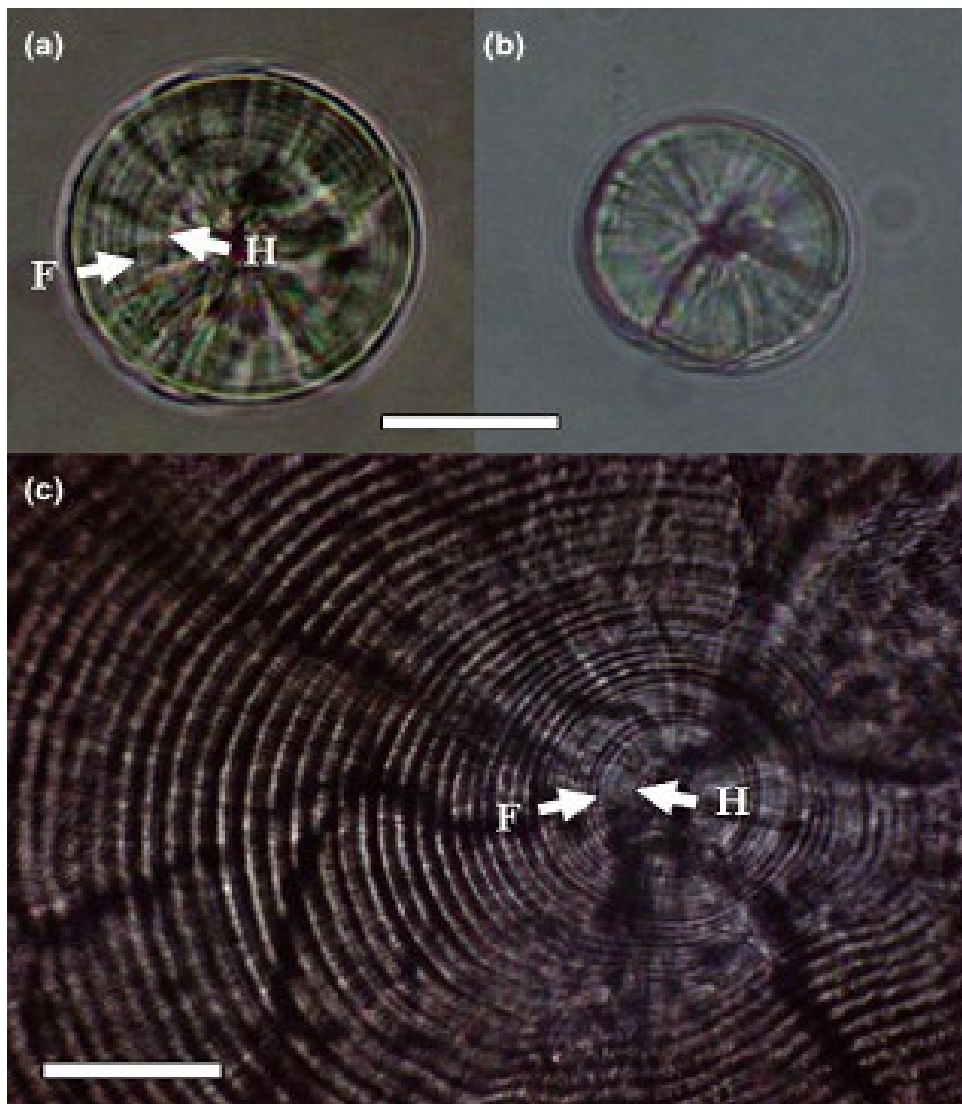
b) lapillus od larvy, která dosahuje velikosti 5,9 mm

c) juvenilní stádium u ryb. kde neznáme věk (chyceny v přírodě), dosahuje velikosti

16 mm a je 54 dní stará, bílý pruh má velikost 100 μ m

Všimněte si, že u sagitty je jasně zaznamenaný první a druhý denní přírůstek a jsou jasně vidět přírůstky další, ale lapillu nejsou tak zřetelné

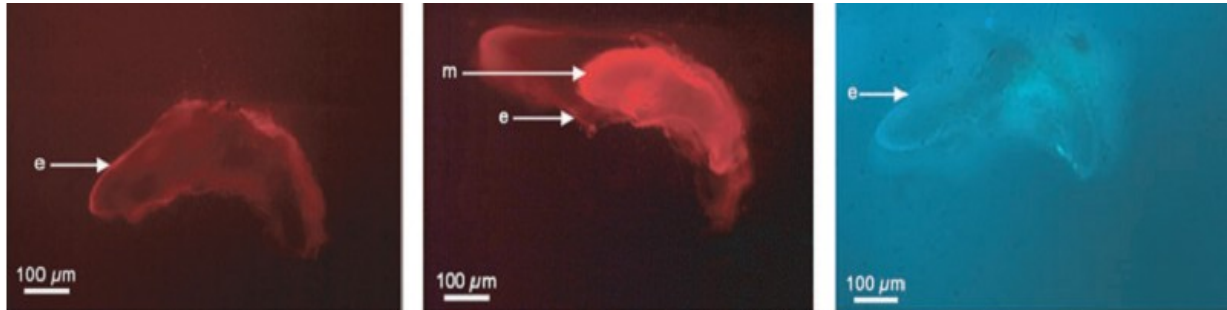
(Islam 2009)



Obr. č. 6

Otolity chemicky označeného jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) starého jeden rok pozorované pod UV světlem (Lochet et al. 2011)

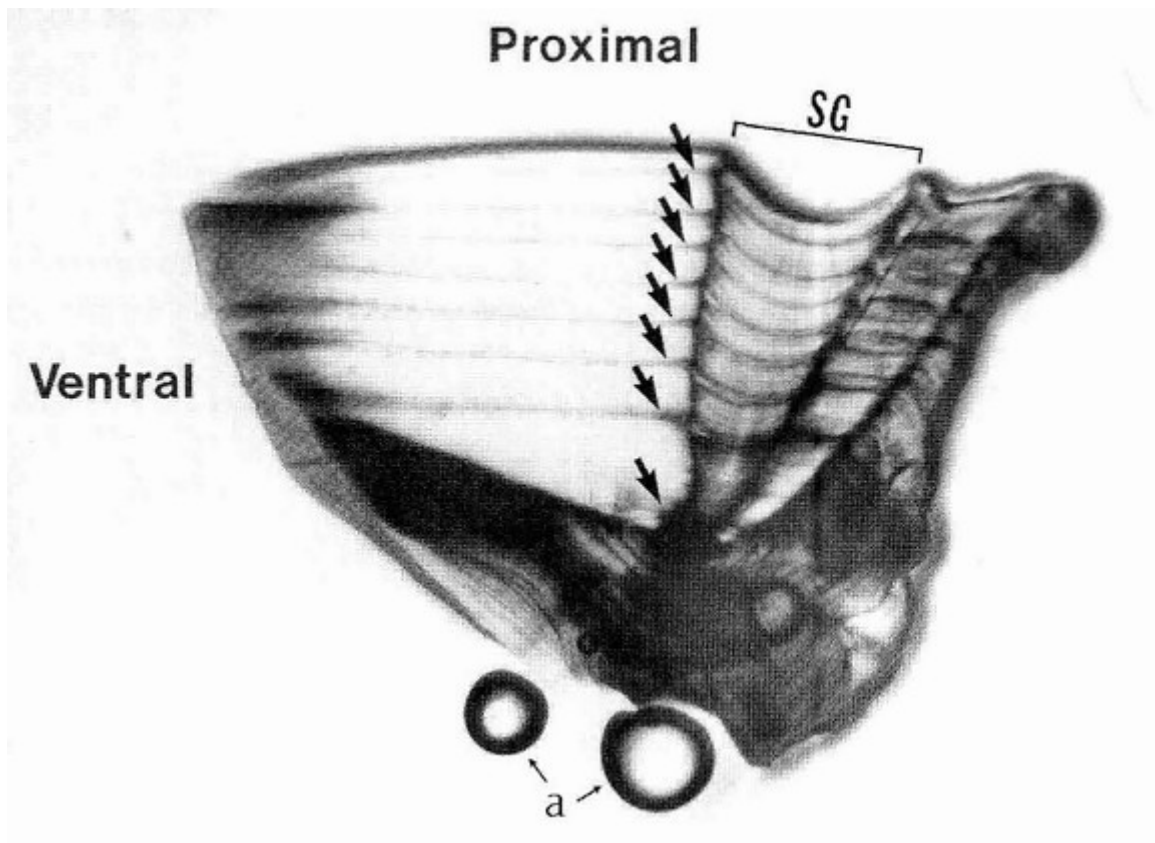
e - hrana kalcifikované struktury, m - značka






Obr. č. 7

Annuli na sagittě osmiletého *Micropogonias undulatus* z čeledi smuhovitých (Barbieri et al. 1994)

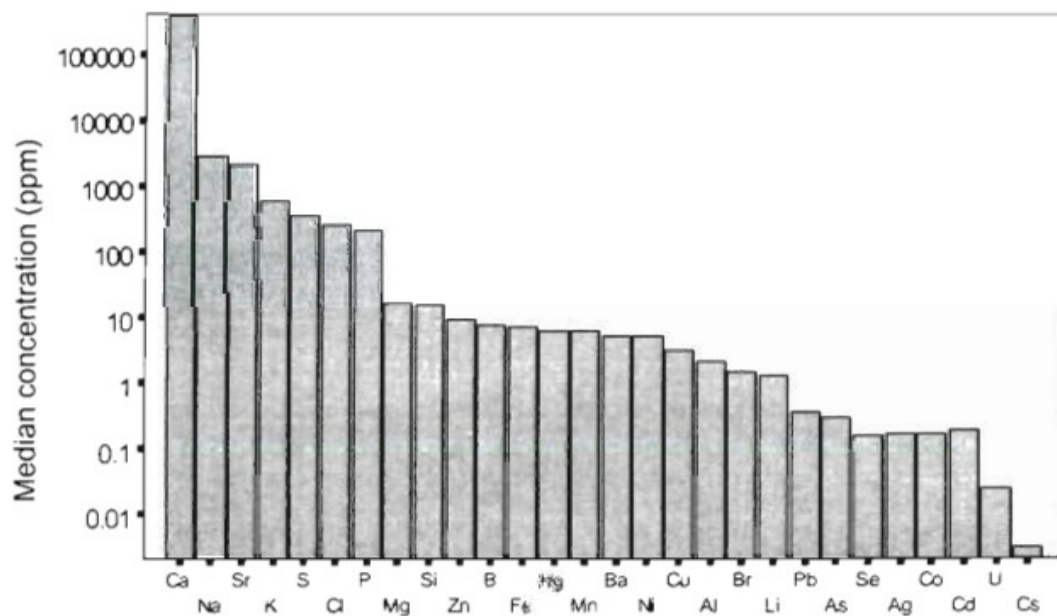
a - artefact, SG - sulcus acusticus, šipky - počet let



8.2 Tabulky

Otolit	Popis	Synonyma	Obrázek
Lapillus pl. lapilli	Zaplňuje utriculu, nachází se nahoře, laterálně a dorzálně od sagitty	Utricular otolith "Otolith" Utricularith	
Sagitta pl. sagittae	Nachází se v dolní části sacculu, u ostatní ch ryb kromě Rypákovitých (Mormiridae) a nadřádu Ostariophysi je to největší otolit	Saccular otolith sagittal otolith "Otolith" Saccularith	
Asteriscus pl. asterisci pl. asteriscuses	Nachází se v lageně na bázi sacculu v jeho koncové části (směrem od hlavy) největší otolit u Rypákovitých (Mormiridae) a nadřádu Ostariophysi	Lagenar otolith "Otolith" Lagenarith	

Tabulka č. 1 - typy otolitů juvenilního morčáka pruhovaného (*Morone saxatilis*) použité jako názorný příklad pro srovnání vzájemné velikosti otolitů (Secor 1991)



Souhrn zastoupení jednotlivých prvků v rybích otolitech (v ppm) napříč všemi druhy.
Tabulka neobsahuje hlavní prvky C, O a N a radioaktivní prvky jako je Th a Ra.
(Campana 1999)