FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Hodnocení čerstvého spermatu ryb

O. Linhart, M. Rodina, S. Boryshpolets

Edice Metodik 114

FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Hodnocení čerstvého spermatu ryb

O. Linhart, M. Rodina, S. Boryshpolets

VYDÁNÍ A TISK PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:

Příprava a vydání metodických publikací v roce 2011
(CZ.1.25/3.1.00/11.00301)

EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investice do udržitelného rybolovu“

OBSAHOVÁ ČÁST METODIKY BYLA ZPRACOVÁNA ZA FINANČNÍ PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ:

Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb
(MZe ČR NAZV QH82119)

Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb
(GAJU 046/2010/Z)

CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
(OPVaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Edice Metodik

ISBN 978-80-87437-32-2

OBSAH

1. CÍL METODIKY **6**

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY **6**
2.1. Úvod **6**
2.2. Odběr spermatu do nádobek **8**
2.2.1. Odběr „vytřeného“ spermatu od živých ryb 8
2.2.2. Získání testikulárního spermatu z čerstvě usmrcených ryb 12
2.3. Krátkodobé uchování spermatu **12**
2.4. Makroskopické hodnocení spermatu **13**
2.5. Mikroskopické hodnocení spermatu **14**
2.5.1. Posuzování pohyblivosti spermií 14
2.5.2. Zjišťování koncentrace spermií mikroskopicky 18
2.6. Charakteristika spermatu u některých druhů ryb **20**

3. ZÁVĚR **22**

4. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ **22**

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY **22**

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY **23**

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **23**

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE **24**

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit rybářské praxi jednoduchý a stručný návod, jak hodnotit sperma ryb v praktických podmínkách rybích líhní, které nejsou vybaveny ideální mikroskopickou a počítačovou technikou.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika poskytuje rybářské veřejnosti přístup k základním metodickým návodům, jak hodnotit sperma ryb. Návody jsou koncipovány tak, aby i přes svoji jednoduchost poskytly odpověď na otázku Jak je sperma kvalitní, případně Jak lze sperma vhodně použít k osemenění a oplození. Publikace nahrazuje metodiku vydanou Linhartem a Pokorným v roce 1984.

2.1. Úvod

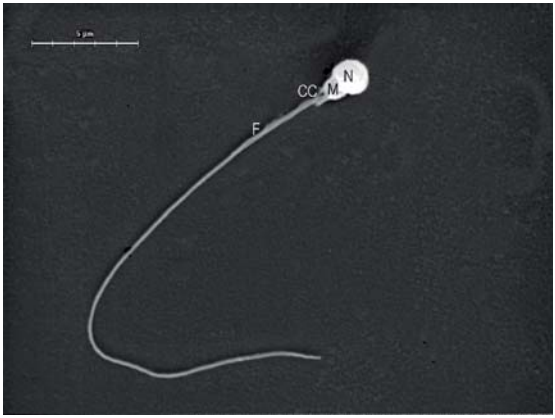
Rozšíření metod řízené reprodukce ryb v provozní praxi do malých objektů se širokou škálou druhů ryb s sebou přináší řadu problémů včetně hodnocení kvality a kvantity spermatu. Oba ukazatele – jak kvalitativní, tak kvantitativní – potřebujeme dobře znát při rozhodování, jak strategicky provést vlastní osemenění a aktivaci, abychom dosáhli co nejlepší oplozenosti jiker. Dobrá oplozenost jiker je nezbytným předpokladem úspěšné inkubace i odchovu váčkového plůdku a tím ekonomické efektivnosti rybochovných objektů. Vysokou oplozenost je možné zajistit pouze dostatečným množstvím kvalitního spermatu a správnou technikou oplozovacího procesu.

U většiny ryb s vnějším osemeněním probíhá spermatogeneze v cystách se Sertoliho buňkami, které vyplňují testes. Po přechodu do fáze spermiogeneze cysty praskají a spermie se uvolňují do jednotlivých kanálků testes, odkud se spolu se spermiální plazmou dostávají do chámovodu a výsledné sperma je vytlačováno na povrch urogenitální papily.

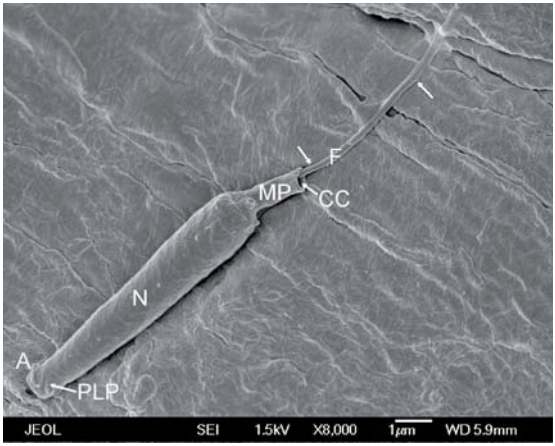
Sperma vedle spermií obsahuje spermiální plazmu, která však není totožná se semennou plazmou (ejakulátem) teplokrevných zvířat, protože u ryb nejsou přídatné pohlavní žlázy. Spermiální plazma nebo také semenná plazma je především produktem Sertoliho buněk a vedle spermií tvoří zhruba 50–90 % spermatu. Normálně utvářená spermie sladkovodních kostnatých ryb má bičíkatý tvar a skládá se z hlavičky bez akrozomu, střední části a bičíku (obr. 1). U chrupavčitých ryb (obr. 2) je hlavička spermie opatřena akrozomem a vyznačuje se delší dobou pohybu oproti spermiím u sladkovodních kostnatých ryb.

Při veškeré práci se spermatem ryb je třeba akceptovat následující specifika:

- k aktivaci pohybu dochází až po styku s vodou (aktivačním médiem);
- doba pohybu spermie je velmi krátká (od 20 s po několik min.);
- pohyb spermií je limitován především vnějšími faktory, a to zejména ionty, sperma vykazuje obrovské mezidruhové rozdíly.



Obr. 1. *Spermie lína obecného* Tinca tinca*: hlavička (N), střední část (M), cytoplasmatický kanál (CC), bičík (F). Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu – SEM. (Pšenička a kol., 2006).*



Obr. 2. *Spermie jesetera sibiřského* Acipenser baerii*: akrozom (A), posterolaterální výběžky (PLP), jádro (N), střední oddíl (MP), cytoplasmatický kanál (CC) a bičík (F). Šipky ukazují začátky laterálních lemů bičíku. Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu – SEM. (Pšenička a kol., 2007).*

2.2. Odběr spermatu do nádobek

Odběrem spermatu do nádobek rozumíme postup, jehož cílem je získat dostatečné množství nekontaminovaného spermatu, případně eliminovat účinek kontaminantů, hlavně moči, použitím imobilizačních roztoků. Na rozdíl od techniky výtěru spermatu přímo na jikry, jež se velmi často používá, nám tento postup umožňuje kontrolu kvality spermatu před jeho použitím. Techniky odběru spermatu lze rozdělit na dvě základní skupiny: Odběr „vytřeného“ spermatu od živých ryb a odběr testikulárního spermatu z čerstvě usmrcených ryb.

2.2.1. Odběr „vytřeného“ spermatu od živých ryb

Technika odběru spermatu se liší podle jednotlivých druhů ryb, především velikosti generačních mlíčáků a předpokládaného objemu spermatu. Vždy platí, že mlíčáka je třeba dokonale fixovat, následuje pečlivé osušení mlíčáka, aby voda nekontaminovala sperma hned po odběru. U druhů choulostivých na manipulaci (např. lipan podhorní, candát obecný) je vhodné použít anestezii. U velkých generačních ryb, jako jsou amur bílý, kapr obecný, velké druhy jeseterů, je použití anestezie nezbytné.

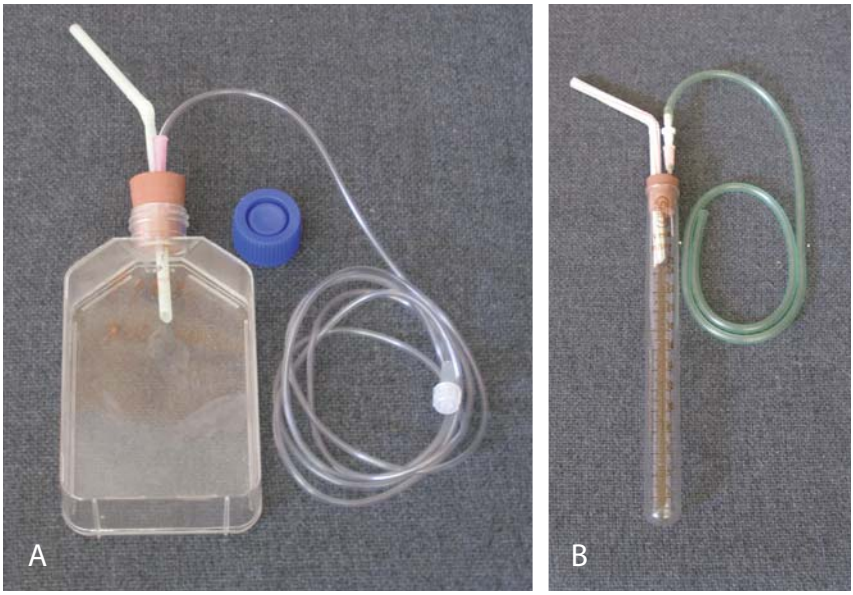
Odběr malých objemů spermatu či „univerzální“ odběr injekční stříkačkou

Malé objemy spermatu (v objemech v desetinách až jednotkách ml), které můžeme očekávat u druhů, jako je např. okoun, štika, parma, obvykle odsáváme plastovou injekční stříkačkou přímo z povrchu urogenitální papily při současné lehké masáži břišní krajiny mlíčáka. Stříkačky se většinou plní do jedné poloviny spermatem. Další část se dosává vzduchem. Stříkačky se následně označí a ukládají v chladu (0–4 °C) mimo přímé sluneční záření.

Odběry velkých objemů spermatu

Velké objemy spermatu například u kapra nebo býložravých ryb obvykle odsáváme tzv. odsávačkami (obr. 3), což jsou nádobky o objemu 50–200 ml s odsávací trubičkou pro sperma a kanylou pro připojení podtlaku. Podtlak vytváříme odsáváním vzduchu z nádobky ústy nebo vývěvou. Sperma je opět odsáváno z povrchu urogenitální papily při současné lehké masáži břišní krajiny mlíčáka v poloze břichem vzhůru (anestezie podmínkou, obr. 4). Plastové nádobky o objemu 200 ml se plní objemem do 20 ml spermatu, označí se a ukládají v chladu (0–4 °C) mimo přímé sluneční záření (obr. 5).

U druhů s větším objemem spermatu je alternativou odběr spermatu výtěrem („odstříknutím“) spermatu přímo do kádinky či jiné vhodné skleněné či plastové nádobky, jak se používá např. u pstruhů. Uzavřené a ne zcela naplněné nádobky se opět ukládají v chladu (0–4 °C) mimo přímé sluneční záření, nebo se sperma přelévá do PE sáčků, které se plní kyslíkem, uzavřou a opět uchovávají v chladu.



Obr 3. *příklady provedení odsávaček. A – používaná pro kapra, B – používaná pro sumce.*

Obr. 4. *Odběr spermatu kapra pomocí odsávačky. (upraveno dle Rodina a kol., 2010).*

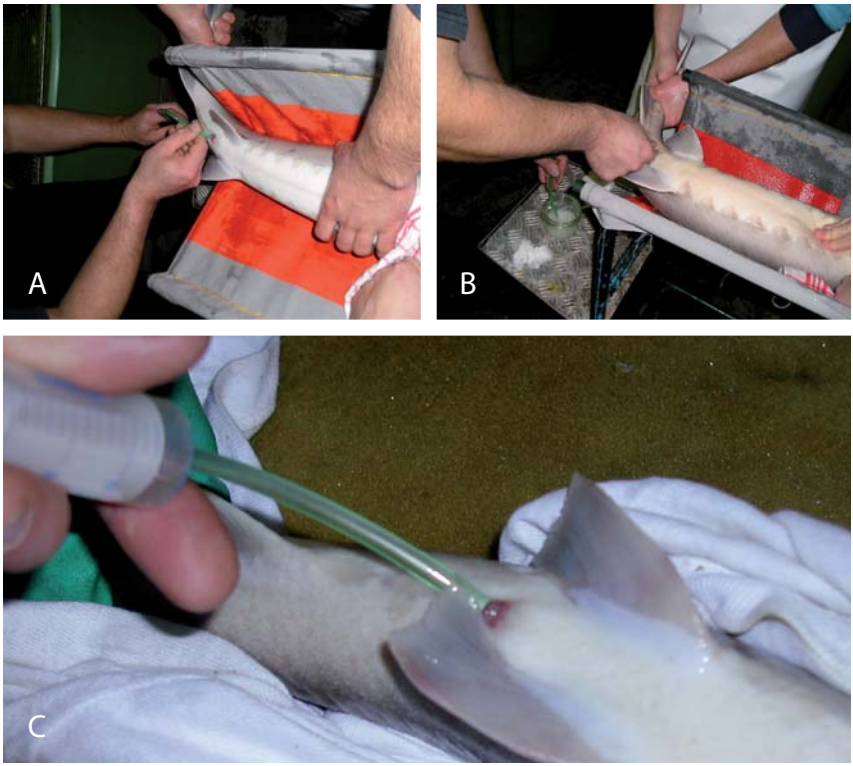
Obr. 5. *Uchování spermatu v termoboxu. (Rodina a kol., 2010).*

Odběr spermatu u jeseterovitých a veslonosovitých ryb

Sperma jeseterů se nejlépe odebírá pomocí katetru – šikmo seříznuté měkké hadičky odpovídajícího průměru (pro jesetera malého 4 mm, pro jesetera ruského a sibiřského 4–10 mm a délky 50 cm) zavedené do urogenitální papily v poloze mlíčáka břichem vzhůru (obr. 6A, B). Sperma při mírném tlaku na břišní krajinu volně vytéká katetrem a je jímáno do odběrné plastové nádobky o objemu 50 nebo 200 ml. Plastové nádobky o objemu 200 ml se plní objemem do 20 ml spermatu a ihned po odběru se označí a ukládají v chladu (0–4 °C) mimo přímé sluneční záření.

Při malých objemech spermatu lze použít injekční stříkačku nasazenou na katetr a sperma opatrně odsát (obr. 6C).

I zde je alternativou odběr spermatu výtěrem („odstříknutím“) spermatu přímo do kádinky (obr. 7) či jiné vhodné skleněné či plastové nádobky, je zde však větší riziko ztrát a možnosti kontaminace.



Obr. 6. *Odběr spermatu jeseterů pomocí katetru.*

Obr. 7. *Odběr spermatu jesetera do kádinky.*

Odběr spermatu kontaminovaného močí

U sumce velkého a lína obecného je sperma vždy kontaminováno močí a musí se odebrat přímo do imobilizačního roztoku (viz metodiky Linhart a kol., 2000a, b). Imobilizační roztoky: sumec velký – 200 mM NaCl, 30 mM Trisu, pH 7 (11,8 g NaCl a 3,6 g Trisu na 1 litr roztoku), lín obecný – modifikovaný roztok Kurokura – 180 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM $CaCl_2.2H_2O$, 2,4 mM $NaHCO_3$ (10,52 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2.2H_2O$ a 0,2 g $NaHCO_3$ na 1 litr roztoku). U obou druhů můžeme sperma ředit maximálně do poměru 1 : 0,9, tedy například 10 ml imobilizačního roztoku a 9 ml spermatu. Při odběru spermatu nejprve nasajeme imobilizační roztok do injekční stříkačky nebo odsávačky o určitém objemu a k němu přisáváme sperma (obr. 8). Sperma uchováváme v chladu (0–4 °C) mimo přímé sluneční záření.

Obr. 8. *Detail odběru spermatu u sumce velkého.*

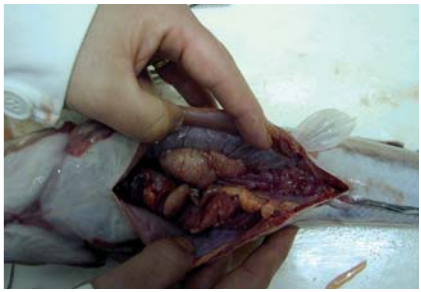
2.2.2. Získání testikulárního spermatu z čerstvě usmrcených ryb

Testikulární sperma – sperma z vypreparovaných gonád usmrcených ryb se používá u druhů s velmi malým objemem spermatu (v kombinaci s kontaminací močí), u kterých není propracované použití imobilizačních roztoků a u kterých mlíčáci brzy pohlavně dospívají a je jich dostatek, jako jsou štika nebo klarias.

Mlíčáka usmrtíme úderem do hlavy a následným přetnutím žaberních oblouků, čímž dosáhneme i částečného vykrvení. Rybu osušíme, nůžkami otevřeme tělní dutinu, opatrně odstraníme trávicí trakt a uvolníme a vyjmeme testes tak, abychom je pokud možno nepoškodili (obr. 9 a 10). Vypreparované gonády osušíme od krve a uchováváme v chladu (na ledu) podobně jako odebrané sperma. Sperma lze použít obvykle do několika hodin, při delším uchování (24 h) je vhodné zkontrolovat pohyblivost spermií.

Testikulární sperma získáme nastříháním tkáně testes, kdy sperma volně vytéká z tkáně. Je možné propasírovat nastříhanou tkáň přes řídkou tkaninu. Získáme tím sice větší objem testikulárního spermatu, ovšem často s poškozenými bičíky spermií. Kontrola pohyblivosti testikulárního spermatu může být znesnadněna drtí tkáně.

Obr. 9. *Odběr testes u mlíčáka štiky.*



Obr. 10. *Odběr testes u mlíčáka klariase.*

2.3. Krátkodobé uchování spermatu

Při krátkodobém uchování spermatu musíme dodržet následující zásady:

- zamezit aktivaci spermií vodou nebo jinými kontaminanty;
- zamezit vysychání, zmrznutí a přístupu přímého slunečního světla;
- snížit metabolickou aktivitu (uchováním v teplotě 0–4 °C, „na ledu“) a omezit rozvoj bakteriální mikroflóry;
- zajistit aerobní prostředí pro spermie (slabá vrstva spermatu, kyslíková atmosféra).

Sperma se tedy po celou dobu od odběru do osemenění uchovává v aerobním prostředí, což můžeme zajistit částečně naplněnými nádobkami, popř. uchováním v PE

sáčcích naplněných kyslíkem při teplotě 0–4 °C. Zcela vyhovující je použití polystyrénových přepravních termoboxů (např. na akvarijní ryby) s vrstvou ledu na dně oddělenou od nádobek se spermatem tkaninou. Dbáme na to, aby sperma nezmrzlo nebo nádobka neležela přímo na přemrzlém ledu nebo těsně u výparníku chladničky.

2.4. Makroskopické hodnocení spermatu

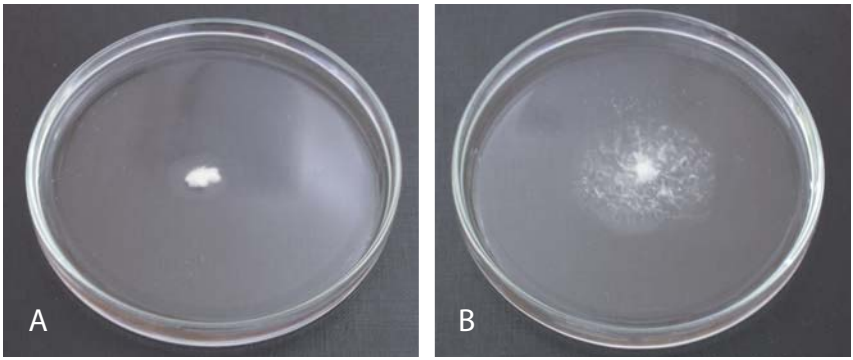
U odebraného spermatu se makroskopicky posuzuje:
a) objem spermatu;
b) hustota a konzistence;
c) barva a přimíseniny;
d) aktivita spermií.

a) Objem spermatu uvádíme v ml. Zaznamenáváme jej spolu s identifikací ryby podle značení a její hmotností. Je dán druhem ryby, velikostí, stářím, zdravotním stavem, hormonální stimulací a fází výtěrové sezony. Orientační objemy, které můžeme očekávat u některých našich hospodářsky významných druhů ryb, uvádí tab. 1.

b) Hustota a konzistence spermatu u jednotlivých druhů je uvedena v kapitole „Charakteristika spermatu u některých druhů ryb". Zaznamenáme, zda je sperma obvykle řidší či hustší. Zajímají nás především odchylky od normálu. Hustota s konzistencí spermatu se člení do pěti stupňů: VH – velmi husté (smetanovité), H – husté (slabě smetanovité), Ř – řídké (mléčné), VŘ – velmi řídké (vodnaté se silným mléčným zakalením), O – oligospermní/aspermické (vodové proti světlu slabě opaleskující, případnou aspermii, tj. nepřítomnost spermií je třeba prokázat mikroskopicky).

c) Barva a přimíseniny spermatu. Barva kvalitního čerstvě odebraného spermatu bývá v závislosti na druhu ryby bělavá, bílá až lehce nažloutlá (barva slonoviny). Jiné barvy bývají známkou kontaminace spermatu: růžová barva kontaminace krví, žlutozelená či nahnědlá kontaminace výkaly. Kontaminace malým množstvím vody, moči či slizu se může projevit zgelovatěním spermatu nebo srážením spermatu. Kontaminované sperma není vhodné ke krátkodobému uchování nebo např. ke kryokonzervaci, přesto je možné jej po prověření pohyblivosti spermií použít k oplození.

d) Makroskopicky lze odhadnout aktivitu spermií pomocí tzv. „kapkového testu": Do Petriho misky na tmavé podložce (nebo podobné nádobky) nalijeme vodu používanou k aktivaci spermií (výška sloupce max. 1 cm). Do ní kápneme pomocí kapátka, pipetky či injekční stříkačky kapku spermatu. Pokud sperma zůstane nahlučeno v kapce a nevytváří znatelný opaleskující až mléčný závoj, jde o sperma obsahující spermie se špatnou aktivitou (obr. 11A). Pokud se vytváří okolo kapky spermatu mléčný závoj, i když část spermatu zůstává nahlučena na místě (jde většinou o husté sperma), potom jde o sperma obsahující aktivní spermie (obr. 11B). Tento způsob hodnocení je vhodný pro husté sperma, např. sperma kapra.



Obr. 11. *Kapkový test se spermatem kapra:*
A – spermie se špatnou aktivitou, B – spermie s dobrou aktivitou.

2.5. Mikroskopické hodnocení spermatu

Uvedené metody jsou určeny pro praktické použití v provozních podmínkách, nejde o metody, které by měly být využívány v experimentálních studiích. Mikroskopické hodnocení nám umožní především posoudit pohyblivost spermií a určit přesnou koncentraci spermií ve spermatu.

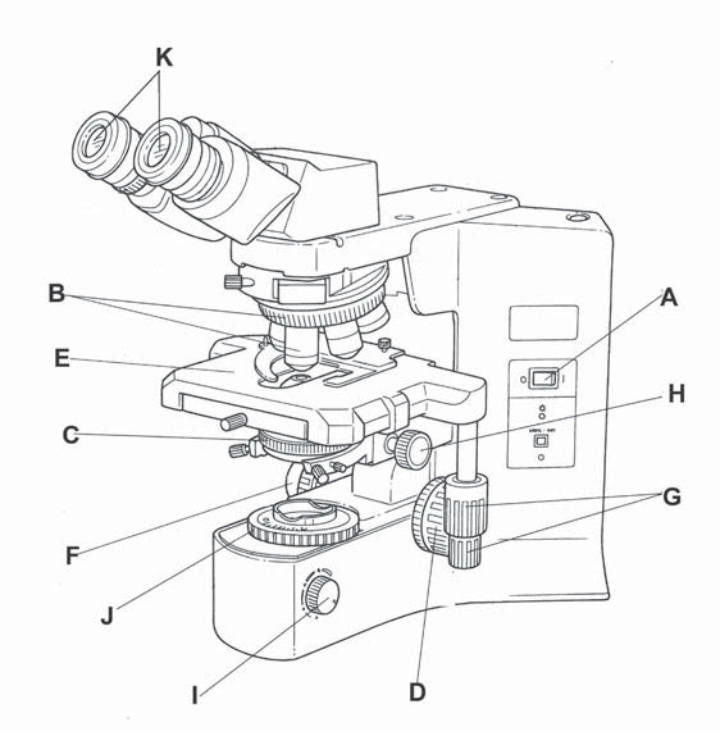
Pro mikroskopické hodnocení spermatu v provozních podmínkách postačuje školní či laboratorní mikroskop pro mikroskopování v průchozím světle a zvětšením 200–400×, tzn. s objektivy 20–40× při použití okulárů 10×. (Obvyklá sada objektivů bývá 5×, 10×, 20×, 40× v kombinaci s okuláry 10× či 15×). Nejvhodnější je mikroskop s vestavěným elektrickým osvětlením, osvětlení pomocí zrcátka či externí lampy je náročnější na nastavení. Pokud mikroskop umožňuje mikroskopování ve fázovém kontrastu nebo tmavém poli, použijeme jej, umožní nám komfortnější pozorování.

2.5.1. Posuzování pohyblivosti spermií

V provozních podmínkách rybích líhní je nejdůležitější odhad procenta pohyblivých spermií, který provádíme přímým pozorováním nativního preparátu aktivovaných spermií ve světelném mikroskopu.

Příprava mikroskopu:

Mikroskop (obr. 12) umístíme na stabilní stůl v místnosti s možností alespoň částečného zastínění před přímým slunečním světlem. Zkontrolujeme kompletnost mikroskopu a zapneme elektrické osvětlení (obr. 12A). Nastavíme objektiv 10× (obr. 12B), kondenzor (obr. 12C) vysuneme do maximální horní polohy, pomocí makrošroubu (obr. 12D) sjedeme se stolkem (obr. 12E) do dolní pozice. Na posuvný stolek mikroskopu položíme čisté podložní sklíčko a se stolkem vyjedeme nahoru tak, že pohledem ze strany kontrolujeme vzdálenost mezi objektivem a podložním sklíčkem, sklíčko se nesmí dotknout objektivu. Potom během pohledu do mikroskopu pomalu mikrošroubem (obr. 12F) sjíždíme se stolkem a snažíme se zaostřit povrch sklíčka, přičemž pohybujeme křížovým posuvem stolu (obr. 12G). Když zaostříme povrch sklíčka, nastavíme objektiv 20× a zkontrolujeme, popř. upravíme, zaostření. Intenzitu světla můžeme korigovat jednak polohou kondenzoru (obr. 12H), regulačním prvkem světelného zdroje (obr. 12I) nebo tzv. polní clonou mikroskopu (obr. 12J). Pokud jsou po zaostření mikroskopu v zorném poli body, které se při pohybu stolku nepohybují, jedná se o nečistoty na okulárech (obr. 12K) v optické soustavě a je třeba je vyčistit, nejlépe čistícími ubrousky na optiku nebo lihem a vatovými tampóny.



Obr. 12. *Mikroskop.*

Příprava preparátu a pozorování pohybu:

Pohyb spermií pozorujeme v otevřené kapce bez použití krycího skla. Na čisté podložní sklo na stolku mikroskopu kápneme pomocí 1 ml injekční stříkačky s jehlou přibližně 50 µl (1/20 ml) vody z líhně nebo odstáté vodovodní vody či používaného aktivačního roztoku. Kapku na podložním skle roztáhneme na plochu 1–2 cm^2 tak, aby byla co nejtenčí. Pokud kapka nejde „rozprostřít", použijeme nové podložní sklo vyleštěné kvalitním suchým papírovým kapesníčkem či plátěným hadříkem (nesmí pouštět chloupky). Další možností je, že do vody přidáme 0,1% BSA. Pokud všechny metody selžou, vyleštíme podložní sklíčko suchým papírovým kapesníčkem, nasliníme jej a opět přeleštíme papírovým kapesníčkem.

V takto rozprostřené kapce na podložním skle aktivujeme malé množství spermatu. Špičku preparační nebo injekční jehly namočíme do spermatu a lehkým ťuknutím jehlou přeneseme do kapky vzorek spermatu. Jehlu ihned otřeme a opatrně s ní zamícháme sperma v kapce na podložním sklíčku. Preparát zasuneme pod objektiv připraveného mikroskopu a rychle doostříme mikrometrickým šroubem.

Jakmile zachytíme pohybující se spermie (vidíme obvykle pouze pohybující se body), snažíme se proostřit celou hloubku kapky. Pohyblivé spermie se totiž zhruba do deseti sekund po aktivaci rozvrství s tím, že se pohybují na dně kapky či při povrchu kapky. Snažíme se vždy o pozorování pohybu spermií jak při povrchu kapky, tak na dně kapky, tedy blíže k povrchu podložního skla. V případě, že je sperma horší kvality, vznáší se nepohyblivé spermie v celém sloupci kapky, a pokud bychom pohyb pozorovali pouze na povrchu kapky nebo podložního skla, došlo by ke zkreslení odhadu, zvláště pokud aktivujeme větší objem spermií.

Odhad pohyblivosti děláme vždy na začátku pozorování hned po zaostření, tedy okolo 10–15 s po aktivaci. Procento odhadujeme ve škále:

- 0 – nepohyblivé spermie, ojediněle pohyblivé (1–2 %);
- 20 % – malé množství pohyblivých bodů;
- 40 % – větší množství pohyblivých bodů, nižší než polovina;
- 60 % – větší množství pohyblivých bodů, vyšší než polovina;
- 80 % – takřka všechny spermie se pohybují;
- 100 % – všechny nebo téměř všechny spermie se pohybují, nepohyblivé spermie jsou zaznamenatelné jen ojediněle.

Cílem odhadu procenta pohyblivosti je roztřídit jednotlivé vzorky do skupin vhodných ke konkrétnímu způsobu použití a vyřadit sperma nevyhovující. Např. pro potřeby zmrazování spermatu je vyžadováno sperma s pohyblivostí min. 80 % a více. Pokud sperma používáme bezprostředně k oplozování, lze v případě potřeby použít i sperma s pohyblivostí 50 %, pokud jsme schopni nahradit sníženou pohyblivost větším objemem spermatu. V nouzi, především u cennějších druhů ryb, např. jeseterů, lze využít

i sperma s nižší pohyblivostí než 50 %, a to opět za předpokladu, že jsme schopni eliminovat sníženou motilitu zvýšeným objemem použitého spermatu.

Pomocným parametrem pohybu spermií je celková doba jejich pohybu (při aktivaci vodou), která by měla více či méně kopírovat hodnoty uvedené v tab. 1 pro jednotlivé druhy ryb. Celkovou dobu pohybu spermií měříme jednoduše stopkami od aktivace spermií v kapce na podložním skle až po zastavení dopředného pohybu hlaviček spermií.

Problémy při pozorování pohybu spermií:

- V případě, že doba pohybu je u většiny sledovaných vzorků výrazně kratší, nejprve vyloučíme nevhodné vlastnosti aktivační vody (především extrémní hodnoty pH či velmi nízký obsah rozpuštěných solí blízký destilované vodě), což můžeme provést kontrolou pH indikátorem a nahrazením vody fyziologickým roztokem 10× zředěným destilovanou vodou. Je-li aktivační voda v pořádku, bývá zkrácení doby pohybu známkou poklesu kvality spermatu, který je způsoben např. částečnou aktivací spermií v průběhu odběru nebo uchování.
- Pokud je naopak doba pohybu u většiny vzorků spermatu výrazně delší, nemusí to znamenat vysokou kvalitu spermatu. Může se jednat o artefakt – chybu způsobenou velkým množstvím spermatu v kapce, které není dostatečně aktivováno. K aktivaci totiž dochází postupně, což se jeví jako prodloužení doby pohyblivosti.
- S aglutinací spermatu neboli shlukováním spermií se u rybích spermií setkáváme obvykle v případě nevhodného aktivačního roztoku či extrémního pH aktivační vody, nezřídka u spermatu, které je kontaminováno močí nebo výkaly. V případě, že dojde k aglutinaci, sperma vyřazujeme a nepoužíváme k oplození.
- Přichycování spermií na podložní sklo. Při pozorování pohybu v zorném poli zaostřeném na povrch sklíčka se někdy stává, že se pohybující hlavičky spermií prudce zastaví nebo se začnou pohybovat jen kývavě na místě. Je to tím, že se „přilepí“ k podložnímu sklu, což je lépe viditelné, pokud pozorujeme spermie ve fázovém kontrastu nebo tmavém poli, kdy je částečně viditelný i bičík spermie. U jeseterovitých ryb vždy dochází k „přilepení“ spermií, pokud voda, kterou používáme, má vysoké pH a vysokou úroveň vápníku. Dochází totiž k aktivaci akrozómu a spermie se „přilepí“ akrozinovým filamentem k podložnímu sklu. I u spermií kostnatých ryb, jako je kapr, okoun, lín atd., se někdy tento fenomén projeví, ačkoliv akrozóm nemají. Lepivost podporují i nečistoty na povrchu skla. Lepivost lze bezpečně zamezit přidáním 0,1% BSA (bovinní sérový albumín, bílkovina krevního séra skotu používaná v mikrobiologii) do aktivační vody nebo aktivačního roztoku. Provozní alternativou může být i již zmiňované naslinění a vyleštění podložního sklíčka.

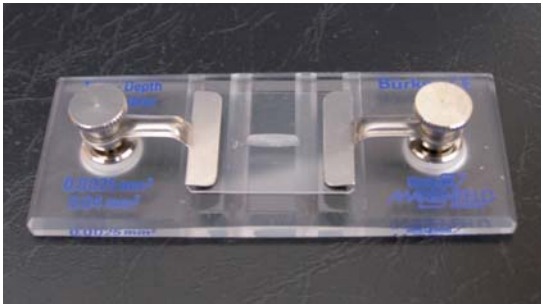
Metodické zásady při odhadu pohyblivosti spermií:

1) Při mikroskopickém hodnocení pohyblivosti vždy používáme stejné zvětšení mikroskopu, stejný druh preparační jehly, stejnou aktivační vodu či aktivační roztok a snažíme se o dávkování zhruba stejného množství spermatu (jedná se o film spermatu na preparační jehle).
2) Procento pohyblivých spermií odhadujeme ve stejném čase po aktivaci, každý vzorek minimálně 2×, lépe 3×.
3) Hodnocení vždy provádí stejný hodnotitel. Pro získání opory v rozhodnutí je možné přizvat dalšího hodnotitele.

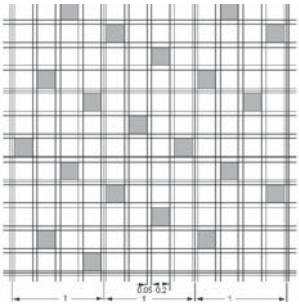
2.5.2. Zjišťování koncentrace spermií mikroskopicky

Koncentrace spermií ve spermatu je udávána v miliardách na mililitr (ml). Zjišťuje se počítáním naředěných spermií pod mikroskopem, v tzv. počítacích komůrkách různých typů a následným výpočtem podle použité počítací komůrky a stupně ředění.

V našich podmínkách se nejčastěji používá Bürkerova počítací komůrka používaná v hematologii (obr. 13 a 14).



Obr. 13. *Bürkerova počítací komůrka.*



Obr. 14. *Rastr Bürkerovy počítací komůrky s vyznačenými 20 čtverci pro počítání.*

Prvním krokem je naředění spermatu. K ředění je možné použít imobilizační roztok pro spermie daného druhu. Pro většinu našich druhů ryb je možné použít fyziologický roztok. U jeseterů přidáváme do fyziologického roztoku 10 mmoll KCl. Poměr ředění volíme podle rozmezí pro jednotlivé druhy tak, abychom měli v jednom čtverci počítací komůrky 3–10 spermií. To znamená, že např. pro kapra, u kterého předpokládáme koncentraci 15–20 × 10^9 * ml^{-1}, zvolíme ředění 10 000×, u druhů s koncentrací spermií do 10 × 10^9 * ml^{-1} zvolíme ředění 5 000×, u jeseterů ředění 500–1 000×.

Pokud máme k dispozici mikropipety, ředíme poměr 10 000× dvoustupňově: do 990 µl fyziologického roztoku napipetujeme 10 µl spermatu, protřepeme, z naředěného spermatu odebereme opět 10 µl a napipetujeme opět do 990 µl fyziologického roztoku a důkladně protřepeme.

Pokud nemáme k dispozici mikropipety, použijeme 1 ml stříkačky („inzulínky") s jehlou. Poměr 10 000× ředíme opět dvoustupňově, tzn. do zkumavky s 9,9 ml fyziologického roztoku přidáme inzulínkou 0,1 ml spermatu, zkumavku uzavřeme, důkladně protřepeme, novou inzulínkou odebereme 0,1 ml předředěného spermatu a přeneseme do 9,9 ml fyziologického roztoku, zkumavku uzavřeme a důkladně protřepeme.

Na vyčištěnou počítací komůrku přiložíme krycí sklíčko, upevníme ho pružnými raménky (obr. 13) a položíme na stolek mikroskopu. Pomocí mikropipety popř. inzulínkou s jehlou přikápneme přibližně 10 µl naředěného spermatu k hraně krycího sklíčka na počítací komůrce tak, aby se vzorek k počítání kapilaritou nasál do komůrky. Spermie necháme sedimentovat 5–10 min. a potom počítáme spermie ve čtvercích komůrky (obr. 14). Započítáváme pouze spermie uvnitř čtverce, které se nedotýkají hranic čtverce, a dále spermie, které se zevnitř dotýkají dvou hranic čtverce (např. levé a dolní strany čtverce). Tímto způsobem spočítáme 20 čtverců po celé ploše komůrky (viz obr. 14) a vypočítáme průměrný počet spermií v 1 čtverci, tzn. sečteme spermie, které jsme spočítali v 20 čtvercích a vydělíme 20.

Výslednou koncentraci následně vypočteme podle vzorce:

Průměrný počet spermií v 1 čtverci × ředění × 0,00025

Například pro ředění 10 000× dosadíme do vzorce: průměrný počet spermií v 1 čtverci × 2,5.

Vypočtený počet spermií je vyjádřen v miliardách na mililitr ($\times 10^9 * ml^{-1}$) viz tab. 1.

Při znalosti objemu spermatu, hmotnosti mlíčáka a koncentrace spermií je možné vypočítat:

- relativní objem spermatu na 1 kg hmotnosti mlíčáka;
- absolutní počet spermií od 1 mlíčáka;
- relativní počet spermií na 1 kg hmotnosti mlíčáka.

Tyto ukazatele jsou důležité pro vyhodnocení reprodukční schopnosti mlíčáků a je nutno k nim přihlížet při komplexním posuzování plemenné hodnoty mlíčáků.

2.6. Charakteristika spermatu u některých druhů ryb

- **Okoun říční** – Velmi husté sperma. Doba pohybu je velmi krátká a někdy nedosahuje ani 15 s. Jde o rybu s močovým měchýřem, tudíž může dojít ke kontaminaci spermatu. Je lepší odebírat sperma u anestezovaných jedinců. Spermie jsou jedny z nejmenších mezi spermiemi ryb.

- **Candát obecný** – Sperma je husté až velmi řídké a vzhledem k samovolnému vyprázdnění močového měchýře může dojít ke kontaminaci močí. Opět je vhodné mlíčáky anestezovat.

- **Lipan podhorní** – Sperma husté až řídké s velmi rozdílnou hustotou a procentem pohybu spermií.

- **Kapr obecný** – Sperma husté, spermie vykazují velmi dobrou pohyblivost. Jeví se velký přebytek spermatu.

- **Lín obecný** – Většinou jde o husté až řídké sperma. Opět mlíčáky anestezujeme, čímž snížíme kontaminaci močí. Sperma vždy odebíráme do imobilizačního roztoku. Doba uchování je poměrně omezena, ideální je použít do 5 h po odběru. Sperma není vhodné ke krátkodobému uchování.

- **Sumec velký** – Sperma je většinou oligospermní. Mlíčáky vždy anestezujeme a při odběru nejprve odstříkneme moč. Odběr spermatu je poměrně dlouhý, někdy až 10 min. Sperma vždy odebíráme do imobilizačního roztoku. Sperma v imobilizačním roztoku můžeme uchovávat v ledničce až 3 dny.

- **Amur bílý a tolstolobik bílý** – Sperma husté až řídké, ve srovnání s kaprem má výrazně kratší dobu pohybu.

- **Síh severní /maréna/** – Sperma husté až řídké s dobou pohybu spermie obdobnou ostatním lososovitým rybám. K závěru výtěrové sezony se významně snižuje procento pohybujících se spermií.

- **Síh peleď** – Sperma je husté. Doba pohybu spermií je mezi lososovitými rybami nejdelší.

- **Pstruh obecný potoční, pstruh americký duhový** – Sperma je většinou husté až řídké s velmi nestabilním procentem pohyblivých spermií.

Tab. 1. *Charakteristika spermatu u některých druhů ryb (VH – velmi husté/smetanovité; H – husté/slabě smetanovité; Ř – řídké/mléčné; VŘ – velmi řídké/vodnaté se silným mléčným zákalem; O – oligospermní/vodové proti světlu slabě opaleskující; ne – obvykle se hormonálně nestimuluje).*

Druh	Štika	Jeseter sibiřský	Okoun	Candát	Lipan	Kapr	Lín	Sumec	Amur	Tolstolob. bílý	Síh maréna	Síh peleď	Pstruh obecný	Pstruh duhový
Doba výtěru, měsíce	březen	prosinec/ březen	duben	duben	duben	květen	červen	červen	červen/ červenec	červen/ červenec	listopad	prosinec	říjen/ listopad	březen/ duben
Výtěrová hmotnost	0,5–2 kg	nad 5 kg	nad 50 g	nad 1,5 kg	nad 200 g	1–5 kg	250–500 g	4–8 kg	2–5 kg	2–5 kg	nad 300 g	nad 300 g	nad 200 g	nad 200 g
Pohlavní dospělost, roky	nad 1	nad 9	nad 1	nad 2	3	2	3–4	3–4	5–8	5–7	2	2	2–3	2
Výtěrová teplota °C	7–12	14–15	10–14	9–14	8–10	18–20	21–24	22–24	22–25	23–25	4–5	3	5–7	8–10
Objem spermií, ml	0,2–3	10–100	0,5–3	0,5–5	1–5	5–50	0,1–2	5–50	5–30	5–30	0,5–5	0,5–5	1–5	1–10
Koncentrace spermií, miliardy/ml	10–30	0,01–0,1	25–35	20	5–15	15–20	10–15	0,001–1	2–10	2–15	5–12	8–15	15–20	15–25
Doba motility spermií	1 min	do 6 min	15–20 s	35 s	30–40 s	1,5–2 min	1,5 min	do 2 min	1 min	1 min	40 s	50 s	35 s	35 s
Makroskopické hodnocení tzn. hustota s konzistencí spermatu	Ř/VŘ	VŘ/O	VH	H	H/Ř	H	H/Ř	O	H/Ř	H/Ř	H/Ř	H	H/Ř	H/Ř
Dávky hypofýzy kapra mg/kg (spermiace v h)	3 (48)	4 (48)	ne	ne	ne	1 (24)	1 (24)	5 (24–48)	ne	ne	ne	ne	ne	ne

3. ZÁVĚR

Uplatnění metod hodnocení spermatu má význam na všech líhních a objektech, kde se provádí umělý výtěr ryb. Oproti metodice Linhart a Pokorný (1984) obsahuje nové pojetí jak makroskopické, tak mikroskopické hodnocení spermatu, včetně kvantitativních a kvalitativních parametrů, kterým by se sperma ryb mělo blížit.

4. SROVNÁVÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Postupy, které zde uvádíme, jsou na první pohled primitivní. Ale právě ona jednoduchost v sobě skrývá tisíce experimentálních či rutinních hodnocení, které jsme v oblasti spermatologie ryb nashromáždili v průběhu posledních třiceti let. Dlouholetost pozorování nás dovedla k vytvoření praktických a jednoduchých návodů. Díky nim je možné i bez mikroskopu a s použitím jednoduchých nádobek schopně a kvalifikovaně odhadnout kvalitu spermatu. Obdobná metodika v literatuře neexistuje, v tomto ohledu spočívá její novost.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika, kterou by se měli řídit všichni líhňaři, najde uplatnění na všech rybích líhních v ČR.

Rozšíření metod řízené reprodukce ryb v provozní praxi s sebou přináší řadu problémů při zabezpečování dobré oplozenosti a její správné diagnostiky. V současné době naše rybochovné objekty a líhně produkují ročně kolem 1 000 mil. jiker a výsledky oplozenosti bezprostředně ovlivňují produkci váčkového plůdku.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Dobrá oplozenost jiker je nezbytným předpokladem úspěšné inkubace i odchovu váčkového plůdku, a tím ekonomické efektivnosti rybochovných objektů. Ekonomický efekt lze demonstrovat na jednoduché modelové kalkulaci: důslednou kontrolou a výběrem používaného spermatu u kapra lze reálně zvýšit oplozenost až o 5 %. Pro rybí líheň produkující ročně 50 mil. váčkového plůdku kapra realizovaného za 20 Kč za 1 000 ks představuje finanční efekt 50 tis. Kč.

U druhů, kde se v podmínkách akvakulturních chovů častěji setkáváme s horší kvalitou spermatu, jako je tomu např. u jeseterovitých ryb, může vést použití neprověřeného spermatu (sperma se sníženou nebo nulovou motilitou) k poklesu oplozenosti a logicky i líhnivosti v řádech desítek procent. Např. od jikernačky jesetera ruského o hmotnosti 10 kg lze reálně získat 1 kg jiker, což představuje 40 tis. ks jiker. V optimálních podmínkách lze dosáhnout oplozenosti 90 % (36 tis. jiker). Při ceně 1 Kč za oplozenou jikru (0,03–0,04 EUR za ks) je to 36 tis. Kč. Pokles oplozenosti o 10 % tedy představuje potenciální ztrátu 4 tis. Kč na 1 kg jiker.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Fish spermatology: Implication for aquaculture management. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.), Fish Spermatology, Alpha Science Ltd, Oxford, pp. 97–460.

Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O. 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. Theriogenology 66: 1355–1363.

Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D., Nebesářová, J., Linhart, O. 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biology of the Cell 99 (2): 103–115.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s.

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

Linhart O., Pokorný J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, VÚRH, Vodňany, č. 14, 13 s.

Linhart O., Gela D., Rodina M., 2001. Umělá reprodukce sumce velkého (*Silurus glanis* L.) s použitím enzymu k odlepkování jiker. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 67, 15 s.

Linhart O., Gela D., Flajšhans M., Rodina M., 2000. Umělý výtěr lína obecného s využitím enzymu při odlepkování jiker. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 63, 14 s.

Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 64, 15 s.

ODBORNÝ EXTERNÍ OPONENT

Doc. MVDr. Miloslava Lopatářová, CSc.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství,
Klinika chorob přežvýkavců (oddělení reprodukce)
Palackého 1/3, 612 42 Brno

ODBORNÝ INTERNÍ OPONENT

Ing. Pavel Vejsada, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Fakulta rybářství a ochrany vod, Ústav akvakultury
Husova třída 458/102, 370 05 České Budějovice

OPONENT ZA STÁTNÍ SPRÁVU

Ing. Vladimír Gall

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

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 114/204534/2011 – 16230/N_{met} ze dne 29. 12. 2011

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

Adresa autorského kolektivu

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (linhart@frov.jcu.cz), Mgr. Sergey Boryspolets, Ph.D., Ing. Marek Rodina, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany,
www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (Technologická řada)
vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod
Redakce: PhDr. Petr Kubát a Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks
Vydáno v roce 2011
Grafický design a technická realizace: Comunica, a.s.

FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
INVESTICE DO UDRŽITELNÉHO RYBOLOVU

VYDÁNÍ A TISK PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:
PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2011
reg. č. CZ.1.25/3.1.00/11.00301

Edice Metodik

ISBN 978-80-87437-32-2