



Zmrazování spermatu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)

O. Linhart, B. Dzyuba, S. Boryshpolets, M. Rodina



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zmrazování spermatu jesetera malého *(Acipenser ruthenus)*

O. Linhart, B. Dzyuba, S. Boryshpolets, M. Rodina

**VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:**

Příprava a vydání metodických publikací v roce 2010

(CZ.1.25/3.1.00/10.00303)



**EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investice do udržitelného rybolovu“**

**OBSAHOVÁ ČÁST PUBLIKACE BYLA ZPRACOVÁNA
ZA FINANČNÍ PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ:**

Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb

(Mze ČR NAZV QH82119)

***Vývoj nových metod chovu vybraných perspektivních akvakulturních druhů
s využitím netradičních technologií***

(MZe ČR NAZV QH71305)

Biologické, environmentální a chovatelské aspekty v rybářství

(výzkumný záměr MSM6007665809)

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA

(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb

(GA JU 046/2010/Z)



ISBN 978-80-87437-03-2

OBSAH

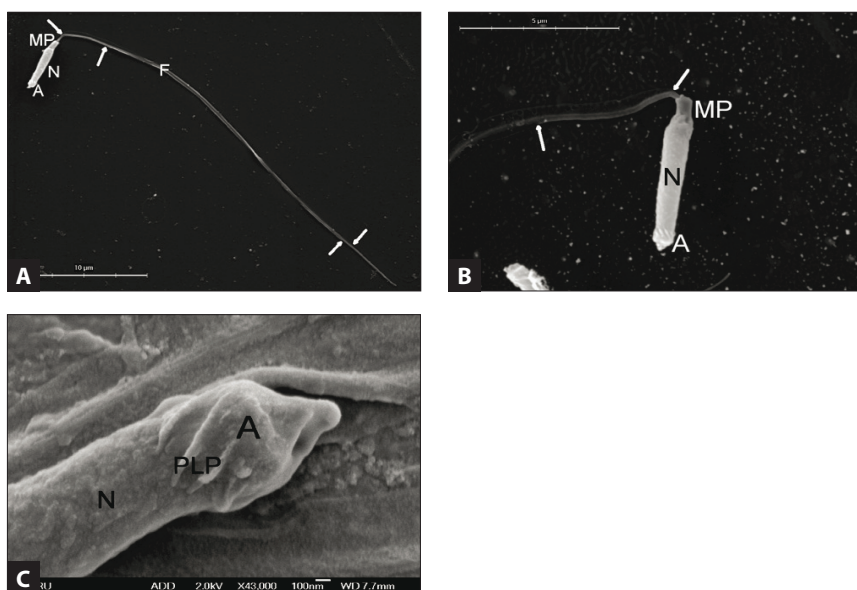
1. ÚVOD	6
1.1. Spermatologie sladkovodních druhů ryb	6
1.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií jeseterů a akrozom	7
1.3. Úvod do kryokonzervace – zmrazování spermií ryb	7
2. CÍL	9
3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA	9
4. POPIS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU	10
4.1. Odběr spermatu	10
4.2. Kontrola kvality spermatu	11
4.3. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet	12
4.4. Vlastní mrazení spermatu	12
4.5. Uložení zmrazených dávek	13
4.6. Evidence zmrazených dávek	14
4.7. Rozmrazení zmrazených dávek	14
4.8. Použití rozmrazeného spermatu k oplození jiker	15
5. VÝSLEDKY	16
6. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT	16
7. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU U PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU	17
8. SEZNAM LITERATURY	18
PŘÍLOHA	21

1. ÚVOD

1.1. Spermatologie sladkovodních druhů ryb

Spermie patří mezi specializované buňky, které jsou u druhů s vnějším osemněním obvykle vypuzeny do vnějšího prostředí, tedy do sladké vody. Spermie jsou nuceny se vyrovnat s extrémně odlišným prostředím v podobě sladké vody, přičemž jejich ochrana proti vnějšímu prostředí je na daleko horší úrovni než u jiker.

Převážná většina znalostí o struktuře spermií ryb a fyziologii pohybu spermií byla zdokumentována na pstruhu duhovém (Billard, 1970; Morisawa a Suzuki, 1985; Boitano a Omoto, 1992; Cosson a kol., 1999; Alavi a kol., 2008). V kontrastu s výsledky u pstruha duhového je mnohem méně informací známo o charakterizaci spermií chrupavčitých druhů, tedy u veslonosa amerického nebo jeseterovitých ryb, které nejsou fylogeneticky příliš vzdáleny spermiím savčích druhů (Pšenička a kol., 2009; obrázek 1). Naproti tomu spermie kostnatých ryb mají fylogeneticky primitivní spermie, tzn. kulatou hlavíčku bez akrozomu s velmi tenkým bičíkem (Pšenička a kol., 2006).



Obr. 1. Ultrastruktura spermie jesetera malého pořízená skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) ukazuje na obrázku **a)** celou spermii (měřítko 10 μm), šípky vyznačují začátek a konec lemu na bičíku; na obrázku **b)** větší detail hlavičky spermie, střední části s částí bičíku (měřítko 5 μm) a na obrázku **c)** s detailem akrozomu na hlavičce spermie (měřítko 100 nm). Akrosom (A), jádro – nukleus (N), střední část (MP), bičík (F), Pšenička a kol. 2009).

1.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií jeseterů a akrozom

Spermie převážně většiny druhů ryb nejsou pohyblivé ve varlatech a v celém genitálním traktu s koncentrací spermií 10^{10} . Vyznačují se krátkou periodou pohybu ve vnějším prostředí, tedy sladké vodě (Cosson a kol., 1999), s dobou pohybu 10–60 s u kostnatých sladkovodních ryb, několika minut (3–9 min) u chrupavčitých ryb a zhruba 30 minut u mořských druhů ryb (Ginsburg, 1968; Billard a kol., 2004; Cosson a kol., 1999). Spermie pstruha duhového byly používány jako specifický model sladkovodních druhů ryb. Faktory prostředí, jako jsou ionty, pH nebo osmolalita, způsobují depolarizaci buněčných membrán a stimulují motilitu spermií. Scheuring (1925) byl první, kdo poprvé podal informace o skutečnosti, že ionty Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} redukují inhibiční účinnost K^+ iontu u spermií pstruha obecného (*Salmo trutta*). Synergický efekt mezi ionty vedl k vytvoření demonstrační studie sledující kontrolu motility změnou membránového potenciálu kombinačním efektem různých iontů (Gatti a kol., 1990; Boitano a Omoto, 1991). Osmotický tlak, koncentrace K^+ spolu se sacharózou a pH semenné plasmu nižším než 7 jsou hlavní inhibiční faktory motility spermií u lososovitých ryb (Morisawa a kol., 1983). U kaprovitých ryb a mořských druhů ryb je hlavním kontrolním faktorem motility spermií osmotický tlak (Linhart a kol., 1991; Redondo-Müller a kol., 1991; Billard a kol., 1995; Perchec a kol., 1997; Morisawa a Suzuki, 1980). Motilita spermií u chrupavčitých ryb a některých ryb kostnatých je z části kontrolována osmotickým tlakem a z části iontovým efektem (Linhart a kol., 1995, 2002; Billard a kol., 1999). Motilita spermií veslonosa amerického je inhibována zvýšenou úrovní velmi malé koncentrace K^+ při pH 7,0 bez doprovodného kumulativního efektu Ca^{2+} , jak dříve ukázali u lososovitých ryb Scheuring (1925), Cosson a kol. (1986, 1989), Christen a kol. (1987). Baynes a kol. (1981) zdokumentoval, že roztoky K^+ (nebo K^+ a Na^+), které běžně neindukují motilitu spermií u pstruha duhového, slouží jako součást aktivačních roztoků po přidání malého množství Ca^{2+} . Spermie pstruha duhového vykazují okamžitě po aktivaci a po celou dobu pohybu spermií cirkulární trajektorii. Bylo prokázáno, že Ca^{2+} ionty v průběhu periody krátkého pohybu jsou odpovědné za cirkulární dráhu spermiie pstruha duhového (Cosson a kol., 1989; Boitano a Omoto, 1992) a slouží rovněž k eliminaci inhibičního efektu K^+ na motilitu spermií. Rozdílný efekt Ca^{2+} iontů byl pozorován u intaktních a demembranovaných spermií mnoha kostnatých ryb (Alavi a kol., 2008).

1.3. Úvod do kryokonzervace – zmrazování spermií ryb

Technika zmrazování, tj. hluboké zmrazování spermií a jejich uchování v kapalném dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), je jedna z biotechnických metod aplikovaných v akvakultuře (Stoss, 1983; Rana, 1995; Gwo, 2000). Zmrazené sperma může být v akvakultuře následně vy-

užito: 1) pro produkci referenční chovatelské zásoby, 2) pro produkci hybridů (s reprodukcí v různém období), 3) v případě rozdílného období reprodukce mlíčáků a jikernáčků, 4) pro snížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním generačních mlíčáků, 5) pro genetické zlepšení v selekčně šlechtitelských programech, 6) při opakování výtěru s využitím specifických mlíčáků, 7) pro uchovávání genetických rezerv u kulturních druhů a 8) pro mezinárodní výměnu spermatu (Gwo, 2000).

Hluboké zmrazování spermií ryb je metoda, jejíž úspěch závisí na velkém množství proměnných, které ve výsledku ovlivňují schopnost spermií oplodnit vajíčko. Jde jednak o kvalitu odebraného spermatu a dále o faktory, které působí v průběhu přípravy a vlastního mrazení spermatu (vnější faktory). Těmito faktory jsou především (Ciereszko a kol., 2000; Brown a Mims, 1999; Leibo a Bradley, 1999; Linhart a kol., 1993, 2000, 2005, 2006; Rodina a kol., 2007):

1. Vhodný extendor a ředění spermií

Extendor, tedy ředící roztok, je roztok obsahující spermiální plasmě podobné organické a anorganické látky a pH. Extendor umožňuje naředění hustého spermatu (koncentrace spermií je běžná u kaprovitých ryb na úrovni 10^9 spermií) a krátkodobé uchování při $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chemické složení extendorů používaných pro zmrazování je velmi široké. Před zmrazováním se sperma ředí extenderem na úrovni od 1 : 1 do 1 : 20 v závislosti na koncentraci spermatu a specifitě druhu.

2. Kryoprotektiva a jeho koncentrace

Kryoprotektiva jsou přidávána k spermatu z důvodu zvýšení přežití spermií v průběhu zmrazování. Hlavní vlastnost kryoprotektiv spočívá ve vyvázání vody s redukcí formování krystalů v průběhu zmrazování nebo v strukturování uniformních krystalů. Další vlastnost spočívá ve vázání elektrolytů, čímž dochází k zamezení tvorby koncentrovaných residuálních nezmrazených roztoků, a tím i snížení bodu tuhnutí v průběhu zmrazování. U velkého množství látek byly identifikovány schopnosti kvalitních kryoprotektiv. Např. dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol (EG), glycerol, methanol a propandiol. Koncentrace kryoprotektiv v kryoprotektivních médiích nebo po finálním naředění spermatu je odlišná druh od druhu s obvyklým rozhraním od 5 do 15 %.

3. Rychlost zmrazování

Rychlost zmrazování je hodnocena jako velmi kritická proměnná ovlivňující úspěch zmrazování. Nejpoužívanější technikou je u spermií a ostatních buněk využití pomalého zmrazování (od $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $1\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu). V průběhu zmrazování jsou krystaly ledu formovány v extracelulárním roztoku, voda se uvolňuje z buněk s vyrovnáváním osmotických úrovní až po dosažení tzv. osmotické ekvilibrace. Při tom dochází ke krystalizaci i uvnitř spermií. Po dosažení nízké vnitřní intracelulární teploty na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je možné buňky bezpečně uchovávat v kapalném dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Optimální zmrazovací rychlost je druhově specifická, musí být vždy ověřena pro určitý druh a kombinaci extenderu, kryoprotektiva, objemu a formy (pejeta, peleta, kryozkumavka) zmrazované dávky.

4. Rychlost rozmrazování

Rychlost rozmrazování je stejně důležitá jako rychlost zmrazování. Zde platí čím rychlejší rozmrazení, tím lépe. Při pomalém rozmrazování hrozí především rekrystalizace vody a mechanické poškození rozmrazovaných buněk.

Optimalizací vnějších faktorů během kryokonzervace sledujeme zachování integrity a funkce buňky a buněčných organel, která je dána především zachováním buněčných membrán a filamentů. U chrupavčitých ryb (jeseterů) je kritické uchování akrosomu v průběhu zmrazování a rozmrazování. Porušení akrosomu v průběhu zmrazování je možné kontrolovat elektronovou mikroskopií nebo fluorescenčním zvýrazněním. Tyto metody jsou ovšem poměrně zdoluhavé. Jako vhodná a experimentálně dostatečující se jeví kontrola akrosomové reakce viditelně v podobě filamentu mezi hlavičkou spermie a podložním sklem (Dzyuba a kol., nepublikováno).

Velké množství studií bylo publikováno o zmrazování spermií u odlišných kostnatých ryb (Stoss, 1983; Rana, 1995; Gwo, 2000). V oblasti zmrazování chrupavčitých ryb, tzn. jeseterovitých a veslonosa, existuje pouze několik publikací (Tsvetkova a kol., 1996; Ciereszko a kol., 1996a,b; Brown a Mims, 1999).

2. CÍL

Cílem technologie bylo jednoduše popsat a ověřit technologii zmrazování spermatu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) pro účely uchování genofondu tohoto druhu ve spolupráci s firmou LINEQ, s r. o. Tato technologie dále může detailně poskytnout popis výrobního postupu zmrazování spermatu jesetera malého různým uživatelům a např.: vysokoškolským pracovištím, rybářským podnikům, veterinárním ústavům a klinikám, které zmrazují sperma tohoto druhu ryby pro účely dlouhodobého uchování. Technologie zmrazování spermatu jesetera malého je v ČR a EU zcela nově detailně propracovaná pro jednotlivé uživatele výsledků. Tato technologie při dodržení celého technologického postupu garantuje dosažení oplozenosti jiker a líhnivosti plůdku na minimální úrovni 10 %.

Technologie může najít uplatnění především na pracovištích odpovědných za zmrazování spermatu ryb, ale rovněž na pracovištích, které chovají ve větším měřítku generační hejno jeseterů a část genofondu generačních ryb chtějí uchovat jen ve stavu zmrazených gamet.

3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA

Vlastní proces ověření technologie probíhal v období 2008–2010 v rámci realizace několika provozních sledování a experimentů spojených s ověřením technologického postupu zmrazování spermatu u jesetera malého v rámci společného ověřování

v praktických podmínkách rybí líhně FROV JU, která svými parametry odpovídá praktickým podmínkám rybářských provozů.

Ověřování technologického postupu zmrazování spermií jesetera malého v praxi byla financována společným projektem NAZV "Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb" (MZe ČR, NAZV QH82119), kde firma LINEQ s. r. o. spolufinancuje vlastní aplikovaný výzkum.

4. POPIS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU

4.1. Odběr spermatu

Mlíčáci jesetera malého jsou připravováni ke spermiaci v odchovných nádržích při teplotě vody 14–15 °C po dobu 6–7 dnů. Vlastní odběr spermatu se obvykle provádí 48 h po hormonální injekci mlíčáků kapří acetonovanou hypofýzou v dávce 3–4 mg.l⁻¹ (Gela a kol., 2008).

Sperma jesetera je odebíráno po zasunutí hadičky (kónicky seříznuté o průměru 4 mm, délce 50 cm) do urogenitální papily (obrázek 2) a je jímáno do odběrné plastové nádoby o objemu 50 nebo 200 ml. Plastové nádoby se plní objemem do 20 ml spermatu a ihned po odběru se vkládají do polystyrénové krabice s ledem (obrázek 3). Sperma se po celou dobu po odběru do zmrazení uchovává v aerobním prostředí při teplotě 0–2 °C, přičemž dbáme na to, aby sperma mezmrzlo nebo nádobka neležela přímo na přemrzlém ledu.



Obr. 2. Odběr spermatu jesetera malého.



Obr. 3. Uchovávání spermatu jesetera malého v plastových nádobkách na ledu, tedy při teplotě 0–2 °C; pohled do otevřeného přepravního boxu.

Při odběru se musí postupovat rychle a opatrně, jinak dojde k „vystříkání“ spermatu. Tzn. po odlovení mlíčáka z nádrže se prstem „ucpe“ urogenitální papila, osuší se místo

kolem papily a okamžitě se zasune katetr (hadička do papily) a odebírá se sperma. Masáží v blízkosti papily se pomáhá odběru spermatu. Zhruba za 3 h je možné odběr spermatu opakovat. Objem spermatu, který získáme od mlíčka o hmotnosti 1 kg, je na úrovni do 20 ml.

4.2. Kontrola kvality spermatu

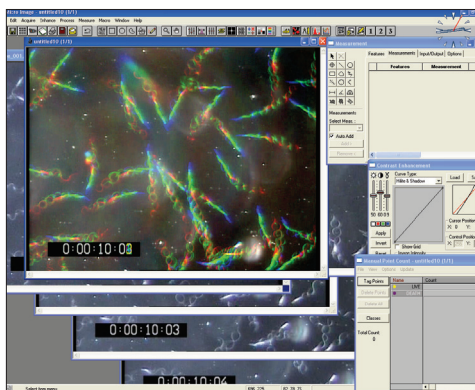
Sperma jesetera malého je bělavá až mléčně bílá tekutina vodnaté konzistence. Koncentrace spermií se obvykle pohybuje v rozmezí $0,1\text{--}1 \times 10^9$ spermií v 1 ml. Kontrola kvality zahrnuje odhad motility spermií (podílu pohyblivých spermií) a určení koncentrace.

Motilita spermií se odhaduje subjektivně mikroskopicky před zmrazením, přičemž procento pohyblivých spermií musí být vyšší než 80 % (Linhart a Pokorný, 1984). Pokud je procento pohyblivých spermií nižší, sperma se nehodí k zmrazování.

K lepšímu odhadu procenta pohyblivých spermií je vhodné použít mikroskop s tmavým polem, stroboskopickou lampu, objektiv 20x s vhodnou CCD kamerou a monitorem, jak detailně popsal Linhart a kol. (2002) ve své publikaci. Procento pohyblivých spermií se odhaduje zhruba při zvětšení 200x, přičemž na podložní sklo se dá 49,5 μl aktivačního media (AM), ($\text{AM} = 10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl} + 1 \text{ mM CaCl}_2 + 10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ TRIS-HCl}$, pH 8,5, s 0,1 % pluronicu) a vmísí se 0,5 μl spermatu. Finální ředění představuje poměr 1 : 100. Pluronic se přidává z důvodu zamezení adheze mezi spermií či akrozomem a podložním sklem, které může zkreslit výsledek. Výsledek pohybu spermií musíme odhadnout do 10 s po aktivaci spermií.

V případě, že jsme vybaveni záznamovou technikou, tzn. videm, DVD či počítačem s dostatečnou kapacitou, můžeme pohyb spermií zaznamenat a následně poměrně velmi objektivně vyhodnotit. K vyhodnocení se používá různý software, který z časové osy obrázků ve své podstatě určí procento pohyblivých spermií a jejich rychlost s dalšími zhruba dvaceti parametry (obrázek 4).

Koncentrace spermatu se určuje počítáním v počítačí komůrce, nejčastěji Bürkerově, po předchozím naředění 400x v neaktivujícím roztoku (např. fyziologický roztok s 10 mM KCl).



Obr. 4. Ukázka vyhodnocování spermatu jesetera malého analýzou obrazu firmy Olympus.

4.3. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet

Sperma jesetera malého se musí před zmrazením naředit ředícím roztokem obsahujícím kroprotektivní látky. Ředící roztok obsahuje 30 mM cukrózy, 1 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 a 10% kroprotektiva – metanolu. **POZOR: metanol je toxický!!!**

Ředící roztok s kryoprotektivem o teplotě 0–2 °C se postupně velmi pomalu “po kapkách” napipetuje do spermatu o téže teplotě (obrázek 5). Naředěné sperma se okamžitě nasaje za pomoci pipety (1 ml) do připravených a označených pejet o objemu 0,5 ml (obrázek 6). Každá pejeta nese označení druhu ryby, číslo ryby a datem zmrazování. Označené a naplněné pejety jsou zobrazeny na obrázku 7.



Obr. 5. Postupné přikapávání ředícího roztoku s kryoprotektivem do spermatu.



Obr. 6. Nasávání naředěného spermatu mikropipetou do označených pejet.

4.4. Vlastní mrazení spermatu

Vlastní mrazení dávek spermatu se provádí v parách nad hladinou tekutého dusíku v „termoboxu”. Příkladem použitelného termoboxu je přepravní polystyrénový box na akvarijní ryby o rozměrech 60 x 40 x 35 cm, s tloušťkou stěny 4 cm a s víkem. Pejety naplněné naředěným spermatem se ukládají na předem připravený polystyrénový rámeček (tloušťka 3 cm) – fungující jako plovák, který se po naplnění přenesle do boxu na hladinu kapalného dusíku. Poté se box na 20 minut uzavře (obrázek 8). Celý proces plnění všech pejet nesmí trvat déle než 5 minut. Teplota se v oblasti pejet na rámečku po uzavření boxu pohybuje na úrovni -130 °C. Po 20 minutách se box otevře a pejety se překloupí do kapalného dusíku, tedy teploty -196 °C.



Obr. 7. Rámeček s označenými a naplněnými pejetami na ledu (0–2 °C).



Obr. 8. Polystyrénový box o hloubce 35 cm, s výškou hladiny kapalného dusíku 7–10 cm.

4.5. Uložení zmrazených dávek

Pejety se přenesou pinzetou do předem označených gobletů (plastových nebo papírových tubusů pro uložení pejet) (obrázek 9), které usnadňují manipulaci s pejetami. S goblety se pracuje pod hladinou kapalného dusíku o teplotě -196 °C tak, aby nedošlo ke znehodnocení dávek jejich „zahřátím“ na více než -80 °C. Goblety s pejetami se ukládají do kanystrů v kontejnerech s kapalným dusíkem (obrázek 10). Dlouhodobost uchování dávek představuje několik let či desítek – stovek let. **Při práci v kapalném dusíku dodržujeme bezpečnostní předpisy!!!**



Obr. 9. Ukládání pejet do gobletů pod hladinou kapalného dusíku.



Obr. 10. Umístění gobletů s pejetami do kanystru v kontejneru.

4.6. Evidence zmrazených dávek

Zmrazené dávky se evidují v protokolu (příloha 1). V protokolu se evidují veškeré detaily o původu mlíčka, metodě zmrazování až po koncentraci spermií a úrovni oplozenosti dosažené po rozmrazení dávky.

4.7. Rozmrazení zmrazených dávek

Zmrazené dávky se vyjmou v gobletu z kanystru kontejneru a vloží se do manipulační polystyrenové nádoby s kapalným dusíkem. Pomocí pinzety se v kapalném dusíku z gobletu vyjme příslušná pejeta (pejetý) a vloží se do lázně o teplotě 40 °C. Pejeta se rozmrazuje za mírného pohybu v teplé lázni podobu 6 sekund (obrázek 11).

Po 6 sekundách se pejeta vyjme z teplé lázně, osuší a odstříhne nůžkami konec pejetý, který není opatřen zátkou. Konec se odstříhne z důvodu kontaminace vodou (obrázek 12).

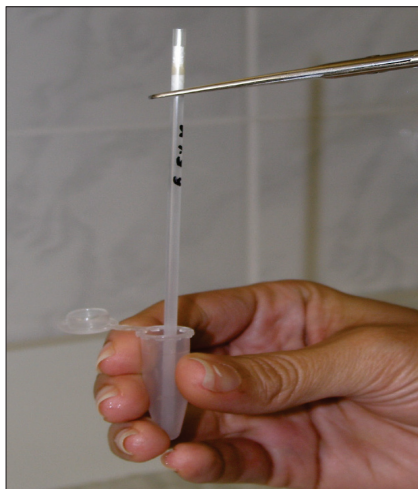


Obr. 11. Lázeň o teplotě 40 °C připravená pro rozmrazování.



Obr. 12. Odstřížení vodou kontaminovaného konce pejetý.

Po odstřížení kontaminovaného konce se pejeta odstřiženou částí vloží do zkumavky a odstříhne se zátko na pejetě (obrázek 13). Obsah pejetý se nechá samovolně vytéct do zkumavky. Zkumavky s rozmrazeným spermatem se okamžitě používají k oplození či k testu pohyblivosti spermií. U jesetera malého bychom měli vždy dosáhnout minimální pohyblivosti na úrovni 20 %. Dosažitelná úroveň při optimální kvalitě spermatu je až 80 %.



Obr. 13. Umístění pejety do zkumavky a následné odstřížení zátky na pejetě.

4.8. Použití rozmrazeného spermatu k oplození jiker

U jesetera malého, jako u dalších jeseterovitých, se používá tzv. „mokrý metoda“ osemenění. Jinými slovy, rozmrazené sperma se nejprve aktivuje smísením s vodou a okamžitě se smísí s jikrami (obrázek 14; Gela a kol., 2008). Při osemenění dbáme na to, aby množství spermií na jednu jikru bylo vyšší než při použití čerstvého, tedy nezmrazeného spermatu.



Obr. 14. Míchání jiker s předem aktivovaným spermatem či současně aktivovaným spermatem s přidáním jiker.

Jestliže se při použití čerstvého spermatu běžně používá 160 000–320 000 spermií na 1 jikru, je třeba počítat s potřebou 320 000–640 000 rozmrazených spermií na 1 jikru, což např. v případě spermatu po rozmrazení (o nativní koncentraci 1×10^9 na ml) činí 24–48 ml spermatu na 1 kg jiker.

5. VÝSLEDKY

Na základě realizace několika provozních experimentů bylo v praxi ověřeno, že popsaná technologie zmrazování spermatu jesetera malého vykazuje vysokou stabilitu výsledků.

Pozornost v rámci ověření technologie v praxi byla věnována především samotné metodě, tzn. metodě zmrazování a rozmrazování spermatu a vlastnímu použití rozmrazených spermií při oplození jiker. Dále byla vyhodnocena i proveditelnost a stálost ověřovaného technologického postupu v praktických podmínkách s nutností uchování zmrazených dávek v kontejnerech a kanystrech běžně dostupných na trhu v ČR.

Popsaná technologie vykazala nejlepší opakovatelné výsledky, které jsme u jednotlivých mlíčáků jesetera malého získali. **S použitím této technologie zmrazování spermatu jesetera malého zaručujeme při dodržení výrobního postupu vždy dosažení minimální pohyblivosti spermií na úrovni 20 %. Dosažitelná úroveň pohyblivosti spermií při optimální kvalitě spermatu je však až 80 %, což je svým způsobem mezi zmrazovacími technologiemi rarita.**

6. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT

Ekonomický efekt používané technologie je závislý na způsobu využitelnosti popsané technologie. Zmrazené sperma jesetera malého může být následně využito: 1) pro produkci referenční chovatelské zásoby, 2) pro produkci hybridů (s reprodukci v různém období), 3) v případě rozdílného období reprodukce mlíčáků a jikernaček, 4) při nížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním generačních mlíčáků, 5) pro genetické zlepšení v selekčně šlechtitelských programech, 6) při opakování výtěru s využitím specifických mlíčáků, 7) pro uchovávání genetických rezerv u kulturních druhů a 8) pro mezinárodní výměnu spermatu.

V případě vytváření banky spermatu pro uchování genetických zdrojů vlastní popsaný technologický postup oproti jiným méně dokonalým technologiím ušetří zhruba 50 % skladovací kapacity kontejnerů.

V případě využití popsaného technologického postupu k snížení ekonomické náročnosti spojené s chovem a udržováním generačních mlíčáků může dojít k snížení nákladů v řádech milionů Kč za rok na jeden chov jesetera malého.

Chov generačních jeseterů je poměrně náročný a náklady na chov mlíčáků se zavedením zmrazení spermatu mohou snížit řádově na 20 % obvyklých nákladů.

7. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU U PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU

Cílem technologie bylo jednoduše popsat technologii zmrazování spermatu jesetera malého pro účely uchování genofondu tohoto druhu. Firma LINEQ je připravena jednotlivé technologické kroky spočívající v roztocích, materiálu až po kapalný dusík nutných k zmrazování spolu s vlastní technologií dodávat pracovištím odpovědným za zmrazování spermatu ryb, ale rovněž pracovištím, které chovají ve větším měřítku generační hejno jeseterů a část genofondu chtějí uchovat ve zmrazeném stavu.

8. SEZNAM 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, UK. pp. 397–460.
- Baynes, S.M., Scott, A.P., Dawson, A.P., 1981. Rainbow trout *Salmo gairdneri*. Richardson, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology* 19: 259–267.
- Billard, R., 1970. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. In: Baccetti, B. (Ed.), *Spermatologia comparata*. Quaderno 137: 71–80.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129: 95–112.
- Billard, R., Cosson, J., Fierville, F., Brun, R., Rouault, T., Williot, P., 1999. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* 15: 199–203.
- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture* 236 (1–4): 1–9.
- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulák, M., Linhart, O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology* 59: 291–296.
- Brown, G.G., Mims, S.D., 1999. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. *Journal of World Aquaculture Society* 30: 245–249.
- Christen, R., Gatti, J.L., Billard, R., 1987. Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *European Journal of Biochemistry* 166: 667–671.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Ochur, S.I., 1996a. Characterisation of acrosin-like activity of lake sturgeon (*A. fluviatilis*) spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 45: 72–77.
- Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., Dabrowski, K., 1996b. Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*A. fluviatilis*) spermatozoa. *Theriogenology* 45: 665–672.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Mims, S.D., Glogowski, J., 2000. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* W.). *Comparative Biochemistry Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology* 125: 197–203.
- Cosson, M.P., Billard, R., Carré, D., Letellier, L., Christen, R., Cosson, J., Gatti, J.L., 1986. Control of flagellar movement in “9+2” spermatozoa: calcium and cyclic AMP dependence, chemotactic behavior. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 6: 237.
- Cosson, M.P., Billard, R., Letellier, L., 1989. Rise of internal Ca^{+2} accompanies the initiation of trout sperm motility *Cell Motility and the Cytoskeleton* 14: 424–434.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C., Suquet, M., 1999. Ionic factors regulating the

- motility of fish sperm In: Gagnon, C. (Ed.), From Basic Science the Male Gamete to Clinical Application. Cache River Press Vienna IL USA. pp. 161–186.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů. Edice Metodik VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.
- Ginsburg, A.S., 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moscow: Nauka, (in Russian). 354 pp.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of aquatic vertebrates semen, review. Aquaculture Research 31: 259–271.
- Leibo, S.P., Bradley, L., 1999. Comparative cryobiology on mamalian spermatozoa. In: Gagnon, C. (Ed.), The male gamete: From basic science to clinical applications. Cache River Press, Vienna, IL, USA. pp. 501–516.
- Linhart, O., Pokorný, J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik VÚRH Vodňany, č. 14, 13 s.
- Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica 16: 285–311.
- Linhart, O., Billard, R., Proteau, J.P., 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture 115: 347–359.
- Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus* R.) and paddlefish (*Polyodon spathula* W.). Journal of Fish Biology 47: 902–909.
- Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology 41: 241–250.
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., Shelton, W.L., Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. Journal of Reproduction 124: 713–719.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability and hatching success of embryos. Cryobiology 51: 250–261.
- Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., Urbanyi, B., 2006. Effects of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilizabilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology 22 (Suppl. 1): 384–388.
- Mims, S.D., 1991. Evaluation of activator solutions, motility duration and short-term storage of paddlefish spermatozoa. Journal World Aquaculture Society 22: 224–229.
- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210: 1145–1147.
- Morisawa, M., Susuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh water cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology 107: 95–103.

- Perchec-Poupard, G., Gatti, J.L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 315–327.
- 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., Vancová, M., Koubek, P., Těšitel, J., Linhart, O., 2009. Fine structure and morphology of sterlet (*A. ruthenus*) spermatozoa and acrosin localization. *Animal Reproduction Science* 111: 3–16.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulák, M., Linhart, O., 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, Sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology* 67: 931–940.
- Rana, J.K., 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Day J.G., Lelland M.R. (Eds), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 151–166.
- Redondo-Müller, C., Cosson, M.P., Cosson, J., Billard, R., 1991. *In vitro* maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Molecular Reproduction Development* 29: 259–270.
- Scheuring, L., 1925. Biologische und physiologische untersuchungen an forellensperma. *Archiv für Hydrobiologie (Suppl. 4)*: 181–318.
- Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds), *Fish Physiology* New York, London. Academic Press. pp. 305–350.
- Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons (*Acipenser baeri* A. *Ruthenus*). *Journal of Applied Ichthyology* 12: 107–112.

Příloha 1.

PROTOKOL O KRYOKONZERVACI Č.

DRUH:

DATUM:

CHOVATEL:

DATUM ODBĚRU:

ČAS ODBĚRU:

ODBĚROVÉ MÉDIUM:

ZPŮSOB ODBĚRU:

ŘEDÍCÍ MÉDIUM:

POMĚR ŘEDĚNÍ:

KRYOPROTEKTIVUM:

KONCENTRACE:

ZPŮSOB MRAZENÍ:

ČAS MRAZENÍ:

MRAŽÍČÍ PROGRAM:

ZAMRAZIL:

**ZNAČENÍ
DÁVEK:**

1000000

[illegible]

ODBORNÝ OPONENT

doc. RNDr. Dalibor Štys, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ústav fyzikální biologie

Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

**Ověření a uplatnění technologie 2010, LINEQ s. r. o.,
V Horce 178, 252 28 Černošice**

Adresa autorského kolektivu:

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (linhart@vurh.jcu.cz),

Mgr. Boris Dzyuba, Ph.D., Mgr. Sergey Boryshpolets, Ing. Marek Rodina, Ph.D.

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

www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (Technologická řada)

*vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
redaktorka Zuzana Dvořáková*

Náklad: 200 ks, předáno do tisku 2010

Grafický design a technická realizace: Lukáš Páral



EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
INVESTICE DO UDRŽITELNÉHO RYBOLOVU

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:
PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2010
reg. č. CZ.1.25/3.1.00/10.00303



ISBN 978-80-87437-03-2